Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf

Die Wirkung chemischer Mutagene auf die Oogenese von Säugetieren

Habilitationsschrift
Der hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Zytogenetik

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Armin Basler

1980

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536502_0027

Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf

Die Wirkung chemischer Mutagene auf die Oogenese von Säugetieren

Habilitationsschrift
Der hohen Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Zytogenetik

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Armin Basler

1980

1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Die Oogenese von Säugetieren	5
2.1.	Die Oogenese der Maus	5
2.2.	Die Oogenese des Syrischen Hamsters	11
3.	Zytogenetische Untersuchungen an Oozyten von Säugern - Literaturbefunde -	13
4.	Alkylierende Agentien	19
4.1.	Trenimon	20
4.1.1.	Physiko-chemische Beschreibung	20
4.1.2.	Wirkungsmechanismus	21
4.1.3.	Induktion von Chromosomenaberrationen	22
4.2.	Mitomycin C	26
4.2.1.	Physiko-chemische Beschreibung	26
4.2.2.	Wirkungsmechanismus	27
4.2.3.	Induktion von Chromosomenaberrationen	30
5.	Material und Methoden	34
5.1.	Chemikalien	34
5.2.	Versuchstiere	35
5.3.	Lösung und Applikation der Testsubstanzen	35
5.4.	Methoden	35
5.4.1.	Oozytenmethode beim Syrischen Hamster	35
5.4.2.	Oozytenmethode bei der Maus	36
5.4.3.	Präparation von Chromosomen des Knochenmarks	36
5.4.4.	Zygotenpräparation	37
5.4.5.	Der Dominant-Letal-Test	39
5.4.6.	Bestimmung des präimplantativen Verlustes	40
5.4.7.	Präparation von Metaphasechromosomen 13, 16 und 18 Tage alter Embryonen	41
5.5.	Versuchsaufbau	41
5.5.1.	Diaplazentare Mutagenese	41
5.5.2.	Applikation in der präovulatorischen Phase	43
5.5.3.	Zeit-Wirkungs-Beziehungen	44
5.5.4.	Subchronische Applikation	45
5.5.5.	Die Auswirkungen der in Oozyten induzierten Mutationen auf die Embryogenese	46
5.6.	Auswertungskriterien	48
5.7.	Statistik	50

6.	Ergebnisse	52
6.1.	Die ovulatorische Phase der Oogenese beim Syrischen Hamster	52
6.2.	Die mutagene Wirkung von Trenimon beim Syrischen Hamster	57
6.2.1.	Applikation in der präovulatorischen Phase	57
6.2.1.1.	Analyse von Metaphase II Oozyten	57
6.2.1.2.	Analyse von Metaphasen aus dem Knochenmark	60
6.2.2.	Subchronische Applikation	62
6.2.2.1.	Analyse von Metaphase II Oozyten	62
6.2.2.2.	Analyse von Metaphasen aus dem Knochenmark	62
6.2.3.	Zeit-Wirkungs-Beziehungen	65
6.2.3.1.	Analyse von Metaphase II Oozyten	65
6.2.3.2.	Analyse von Metaphasen aus dem Knochenmark	67
6.3.	Die mutagene Wirkung von Mitomycin C bei der Maus	70
6.3.1.	Applikation in der präovulatorischen Phase	70
6.3.1.1.	Analyse von Metaphase II Oozyten	70
6.3.1.2.	Analyse von Metaphasen aus dem Knochenmark	70
6.3.2.	Diaplazentare Mutagenese	75
6.3.3.	Analyse von Zygotenstadien	79
6.3.4.	Voruntersuchungen zum präimplantativen Verlust	83
6.3.5.	Der Dominant-Letal-Test	84
6.3.5.1.	Sektion am 13. Tag post coitum	84
6.3.5.2.	Sektion am 16. Tag post coitum	85
6.3.6.	Chromosomenaberrationen in lebenden Implantaten	87
7.	Diskussion	90
7.1.	Der Oozytentest	90
7.2.	Die Induktion struktureller Chromosomenaberrationen durch Trenimon in Metaphase II Oozyten - Speziesvergleich -	92
7.3.	Vergleich der an Oozyten und Zellen des Knochenmarks erhobenen Befunde nach einmaliger und subchronischer Injektion von Trenimon	95
7.4.	Mechanismen der Entstehung von Chromosomenaberrationen in Metaphase II Oozyten durch Trenimon	99
7.5.	Das Non-disjunction Problem	101

7.6. Mechanismus der Entstehung von Chromosomenaberrationen durch Mitomycin C - Vergleich der Befunde an Oozyten, Zygoten und Zellen des Knochenmarks - 105

7.7. Stadiensensibilität der Oogenese
- Diaplazentare Mutagenese - 111

7.8. Elimination von Chromosomenaberrationen während der Embryogenese 114

7.9. Das genetische Risiko beim Menschen nach Zytostatikatherapie 118

8. Zusammenfassung 120

9. Literatur 123

1. Einleitung

Mutationen, also erbliche Veränderungen des genetischen Materials, sind erwiesenermaßen eine der Triebfedern der Evolution. Sie lieferten und liefern das Ausgangsmaterial, an dem andere Evolutionsfaktoren wie Rekombination, Selektion, Migration, Gendrift und Isolation angreifen konnten und können. Obwohl also Mutationen als Initiatoren für eine Evolution notwendig sind, betrachten Genetiker mutationsauslösende Umwelteinflüsse mit äußerster Skepsis.

Ersichtlich wird der Widerspruch, wenn man sich vor Augen hält, daß mutationsauslösende Ereignisse in einem hochentwickelten Säugerorganismus in vielen Fällen von beträchtlichem Krankheitswert sind. Ihre Auswirkungen reichen von Fertilitätsstörungen, embryonalem und perinatalem Tod bis zu Erbleiden unterschiedlichsten Schweregrades. So wurde errechnet, daß unter den klinisch erfaßbaren Aborten der Anteil mit Chromosomenaberrationen 25% (WHO-Bericht Nr. 461 über "Spontaneous and induced abortions" von 1970) bis 50% (CARR u. GEDEON, 1977) beträgt, von denen der überwiegende Teil auf Neumutationen zurückzuführen ist. Von den Chromosomenaberrationen unter Geburten (ca. 0,5%) führt JACOBS (1972) 25% der strukturellen und sogar 100% der numerischen Aberrationen auf Neumutationen zurück. Nur in extrem seltenen Fällen wurde von Frauen mit Trisomie 21 berichtet, die Kinder mit Down-Syndrom zur Welt gebracht, also numerische Aberrationen vererbt hatten. Darüberhinaus dürfte auch von den vielfältigen Krebserkrankungen ein Teil auf mutative Veränderungen von Körperzellen des Erkrankten zurückgehen (BAUER, 1928).

Die Ursachen der beim Menschen "spontan" auftretenden Mutationen sind in vielen Fällen bisher nicht aufklärbar. Andererseits haben die intensiven Untersuchungen der letzten Jahre auf dem Gebiet der experimentellen Mutagenese ergeben, daß durch verschiedenste Umweltfaktoren die Mutagenitätsfrequenz auch beim Säuger erhöht wird.

Bereits 1927 gelang MULLER der Nachweis, daß Röntgenstrahlen bei Drosophila Mutationen induzieren. Seine Bemühungen, vergleichbare Effekte mit Chemikalien zu erzielen, blieben jedoch ohne Erfolg. Erst in den Jahren 1942-1946 konnten zwei

Arbeitsgruppen an unterschiedlichen Organismen den Nachweis chemisch induzierter Mutationen erbringen. AUERBACH (1943), sowie AUERBACH und ROBSON (1944) wiesen an Drosophila die mutagene Wirkung des Senfgases nach, während OEHLKERS (1943) unter anderem an Oenothera die Induktion von Chromosomentranslokationen in der Meiose durch Behandlung mit Urethan aufzeigte.

Seit diesen Anfängen der CHEMISCHEN MUTAGENESE sind Jahrzehnte vergangen bis die Erkenntnis, daß Chemikalien Mutationen zu induzieren vermögen, Auswirkungen auf die Prüfung und Zulassung von Chemikalien und Eingang auch in die einschlägigen Gesetzeswerke (Arzneimittel-, Chemikaliengesetz) fand. Während heute Einigkeit über die Notwendigkeit der Mutagenitätsprüfung herrscht, bestehen weiterhin Diskussionen über die zu verwendenden Testsysteme, bedingt durch die Komplexität der sich stellenden Fragen: 1) Welcher Art sind die induzierten Mutationen? Sind es Punktmutationen, strukturelle Chromosomenaberrationen oder Genommutationen? 2) Werden überwiegend Keimzellen oder somatische Zellen betroffen? 3) Falls Keimzellen betroffen sind, stellt sich die Frage, a) welche Stadien der Keimzellentwicklung betroffen sind, und b) ob die Mutationen auf die nächste Generation vererbt werden, oder c) ob eine Eliminierung während der Keimzellentwicklung und/oder während der Embryogenese stattfindet. Hieraus ergibt sich, daß je nach Fragestellung verschiedene Testsysteme anzuwenden sind (Zusammenstellung gebräuchlicher Standardtestsysteme in KILBEY et al., 1977).

Zu den relevantesten und gebräuchlichsten Testmethoden zur Prüfung auf strukturelle Chromosomenaberrationen beim Säuger in vivo gehört die Chromosomenanalyse aus dem Knochenmark (SCHMID u. STAIGER, 1969) des Chinesischen Hamsters, der Maus oder der Ratte. Dieser Test ist zu einem der wichtigsten zytogenetischen Verfahren geworden, resultierend aus folgenden Vorteilen: Zum einen ist die Zahl der zytologisch auswertbaren Metaphasen mit bis zu mehreren Hundert pro Tier außerordentlich hoch, zum anderen ist die Versuchsdurchführung relativ einfach. Schließlich ist die Knochenmarkmethode gut in die akute toxikologische Routineprüfung integrierbar.

Die hohe Praktikabilität der Methode sollte aufgrund der oben gestellten Fragen nicht dazu führen, sich bei Mutageni-

tätsuntersuchungen auf Chromosomenanalysen somatischer Zellen zu beschränken. Zum anderen bestehen Sensibilitätsunterschiede zwischen verschiedenen Organen und Geweben gegenüber chemischen Mutagenen. Schließlich ist für eine Risikoabschätzung notwendig zu wissen, ob die Nachkommenschaft betroffen ist, was wiederum nur dann der Fall ist, wenn zuvor Keimzellen der P-Generation geschädigt wurden.

Aus diesen Gründen werden Untersuchungen an Keimzellen nach Möglichkeit mit in die Untersuchungen einbezogen, wobei insbesondere die Zellen der Spermatogenese als brauchbares Objekt zur Testung von Mutagenen betrachtet werden. Ermöglicht wurde dies unter anderem durch Arbeiten von LEBLOND und CLERMONT (1952a,b), die den Spermatogeneseverlauf bei Säugern beschrieben, sowie der Lufttrockenmethode zur Präparation meiotischer Chromosomen durch EVANS et al. (1964).

Im Gegensatz zu Untersuchungen an somatischen Zellen und Keimzellen männlicher Säuger liegen nur wenige zytogenetische Befunde vor, die an Oozyten erhoben wurden (s. 3. Literaturbefunde), wahrscheinlich bedingt durch präparationstechnische Schwierigkeiten. Diese Untersuchungen lassen vermuten, daß verschiedene Stadien der Oogenese unterschiedlich sensibel auf Mutagene reagieren, zumindest auf ionisierende Strahlen. Desweiteren zeigen bisher durchgeführte Arbeiten, daß von den in Oozyten induzierten Mutationen ein Teil während der Embryogenese eliminiert wird. Weniger klar ist allerdings die Wirkung von Chemikalien auf die Oogenese, da in den wenigen Arbeiten hierzu die Untersuchungen in der Regel auf einzelne Stadien der Oogenese beschränkt blieben. Wie Untersuchungen mit alkylierenden Chemikalien zeigen (s. 3. Literaturbefunde), sind die Resultate sogar widersprüchlich und nur schwer interpretierbar.

In der vorliegenden Arbeit sollen nun unter Verwendung von Alkylantien die Wirkung chemischer Mutagene auf die Oogenese von Säugetieren und ihre Auswirkungen auf die Embryogenese untersucht werden:

1) Zur Untersuchung von Stadiensensibilitäten werden Säuger mit Zytostatika zu verschiedenen Zeiten der Oogenese behandelt. Die Testsubstanz soll somit auf primordiale Keimzellen, Oogonien, Oozyten im Zygotän/Pachytän oder im Diktyo-

tän Stadium einwirken. Die Analyse wird dann an Oozyten im Metaphase II Stadium erfolgen.

2) Im letzteren Fall (Wirkung auf das Diktyotän Stadium) sollen des weiteren Zeit-Wirkungs-Beziehungen untersucht werden. Das heißt, die Applikation soll in der präovulatorischen Phase, eine Woche oder vier Wochen vor Aufarbeitung der Oozyten erfolgen.

3) Während in den obigen Versuchen die Testsubstanz nur einmal injiziert wird, sollen des weiteren die Auswirkungen subchronischer (10x) Applikationen mit denen nach einmaliger Gabe verglichen werden.

4) Um Sensibilitätsvergleiche zwischen Keimzellen und somatischen Geweben anstellen zu können, werden von ein und demselben Tier sowohl Oozyten als auch Zellen aus dem Knochenmark analysiert.

5) Nach Induktion von Mutationen in Oozyten während des Diktyotäns und erfolgter replikativer DNA-Synthese sollen die Auswertungen zytologisch an Zygoten erfolgen, um so Aussagen zum Mechanismus der Entstehung von Chromosomenaberrationen in Keimzellen machen zu können.

6) Die weitere Entwicklung und mögliche Elimination von Embryonen mit Mutationen soll dann durch Analysen präimplantativer, 13, 16 und 18 Tage alter Embryonen geklärt werden.

7) Die bisherigen Untersuchungen von Oozyten des Säugers erfolgten fast ausschließlich an der Maus. Nach Entwicklung einer Oozytenmethode beim Syrischen Hamster (Mesocricetus auratus) wird diese Spezies in die Mutagenitätsuntersuchungen mit einbezogen.

2. Die Oogenese von Säugetieren

Aufgrund der Befunde an somatischen Zellen (BENDER et al., 1974), an männlichen (RÖHRBORN, 1970c) und weiblichen Keimzellen (RÖHRBORN u. BERRANG, 1967) nach Anwendung des Dominant-Letal-Tests ist zu vermuten, daß auch verschiedene Stadien der Oogenese unterschiedlich sensibel auf chemische Mutagene reagieren. Somit setzt die Planung von Mutagenitätsversuchen beim Säuger in vivo als auch die Interpretation der Befunde die Kenntnis des Oogeneseverlaufs der bei den tierexperimentellen Versuchen eingesetzten Spezies voraus. Im folgenden soll daher die Oogenese des Säugers, zunächst am Beispiel der Maus (2.1.), beschrieben werden, um dann (2.2.) die beim Goldhamster vorkommenden Abweichungen darzulegen. Dabei soll weniger auf histologische Befunde eingegangen werden als auf zytologische Daten, insbesondere auf die stattfindenden Kernphasewechsel.

2.1 Die Oogenese der Maus

Die primordialen Keimzellen entstammen nicht dem sogenannten "Keimzellenepithelium" der Ovarien, sondern haben ihren Ursprung außerhalb der Gonaden. Aufgrund ihrer Form, Struktur und großen Affinität zu Toluidinblau (SPIEGELMANN und BENNETT, 1973; ZAMBONI und MERCHANT, 1973) sowie durch das Vorhandensein alkalischer Phosphataseaktivität (CHIQUOINE,1954; JEON und KENNEDY, 1973) können sie in 8 Tage alten Embryonen zerstreut zwischen den Endodermzellen des caudalen Darmes und dem Dottersackepithel nahe der Allantoisanlage nachgewiesen werden. Vom neunten Tag der embryonalen Entwicklung an beginnen die primordialen Keimzellen durch amöboidale Bewegungen (BLANDAU et al., 1968; ZAMBONI u. MERCHANT, 1973) über das dorsale Mesenterium in das Keimepithel der Gonadenanlage einzuwandern. Das Vorhandensein nur weniger Pseudopodien (JEON u. KENNEDY, 1973) läßt aber darauf schließen, daß neben der amöboiden Eigenbewegung andere bisher unbekannte Mechanismen eine Rolle bei der Bewegung primordialer Keimzellen spielen. Auch während dieser Wanderung können sie nur aufgrund der Phosphataseaktivität nachgewiesen werden (MINTZ, 1960). Die Einwanderung der primordialen Keimzellen ist am 12. Tag p.c. weitgehend abgeschlossen (MINTZ, 1960; ZAMBONI und MERCHANT, 1973).

Unmittelbar darauf differenzieren sich die sex-chromatin-positiven primordialen Keimzellen (WITSCHI, 1957) in sex-chromatin-negative Oogonien (OHNO et al., 1961). Die Oogonien, eventuell auch die primordialen Keimzellen während der Wanderung, vermehren sich durch wiederholte mitotische Teilungen. Während bei 9 Tage alten Embryonen nur 400-480 gezählt wurden, waren es bei 12 Tage alten schon 2000 - 2500 (CHIQUOINE, 1954). Um den 14. ($\pm$1) Tag p.c. tritt die letzte Generation der Oogonien in die Mitose.

Die postmitotischen Kerne ihrer Tochterzellen - der Oozyten - durchlaufen zunächst die G_1-Phase (etwa 10 h Dauer) und treten dann in die S-Phase (HILSCHER et al., 1974), deren Dauer mit 10 1/2 - 12 Stunden angegeben wird (CRONE et al., 1965). Jeweils 1/3 aller Keimzellen durchlaufen diese letzte replikative DNA-Synthese der Oogenese am 13., 14. und 15. Tag der Embryonalentwicklung (PETERS et al., 1962; LIMA DE FARIA und BORUM, 1962). Das G_2-Stadium scheint sehr kurz zu sein; die Minimallänge beträgt weniger als eine halbe Stunde.

Im Leptotän, mit einer Länge von 3-6 Stunden (CRONE et al., 1965), treten die Chromosomen als einzelne lange, dünne Fäden auf, bei denen eine Längsspaltung lichtmikroskopisch noch nicht nachweisbar ist.

Zu einer Paarung der homologen Chromosomen und zur Bildung des sogenannten "BOUQUETSTADIUMS" kommt es im Verlauf des 12-40 Stunden dauernden Zygotänstadiums (CRONE et al., 1965). Zu diesem Zeitpunkt der Oogenese findet noch eine geringe DNA-Syntheseaktivität statt (PETERS et al., 1962), die in ihrer Replikation verzögert ist gegenüber der prämeiotischen S-Phase. Autoradiographische Untersuchungen zeigen, daß die Zygotän-DNA-Synthese randomisiert verstreut über die Chromosomen abläuft (CHANDLEY, 1978). Welche Rolle dieser spät replizierenden DNA-Synthese zukommt, es sind nur 0,3% der gesamten prämeiotischen DNA-Syntheserate, zeigten Untersuchungen von STERN und HOTTA (1969) an Liliaceen. Eine Hemmung der DNA-Synthese zu Beginn des Zygotäns durch den DNA-Synthese-Inhibitor Desoxyadenosin, verhindert die Bildung synaptischer Komplexe. Der Zygotän-DNA scheint somit eine funktionelle Rolle bei der Chromosomenpaarung zuzukommen.

Im über 60 Stunden dauernden Pachytän (BORUM, 1961; CRONE et al., 1965) findet eine weitere Verkürzung der Chromosomen

statt. Die Bivalentenbildung wird abgeschlossen und die im Zygotän bereits aufgetretenen Crossover werden in Form von Chiasmata deutlich sichtbar. Im Gegensatz zur Copy-choice Hypothese, nach der Crossover schon in der prämeiotischen S-Phase stattfinden soll, steht das von WHITEHOUSE und HASTINGS (1965) vorgeschlagene Modell. Dieses bringt die Notwendigkeit von Bruch und Wiedervereinigung in Einklang mit der im Zygotän und Pachytän auftretenden geringen Protein- und unscheduled DNA-Synthese.

Am 16. Tag p.c. haben fast alle Oozyten das Pachytän erreicht, das bis zum 18. Tag p.c. vorherrscht, obgleich sich schon einige Oozyten im frühen Diplotän befinden (BORUM, 1961).

Um den 19. Tag p.c. beginnen die Oozyten vermehrt vom Pachytän zum Diplotän überzugehen. Die homologen Chromosomen werden in diesem Stadium durch einen ständig erweiternden Reduktionsspalt voneinander getrennt, bleiben jedoch noch durch Chiasmata verbunden. Ihre Anzahl verringert sich im Laufe des Diplotän durch stattfindende Terminalisation.

Vom 1. bis zum 4. Tag nach der Geburt werden alle nichtdegenerierenden Maus-Oozyten von Follikelzellen umgeben, die somit den Primärfollikel bilden. Die Chromosomen, die im frühen Diplotän noch deutlich sichtbar sind, entspiralisieren sich extrem, so daß sie auch elektronenmikroskopisch nicht mehr als solche erkennbar sind (TSUDA, 1965). Somit findet ein Wechsel zu einem Interphase-ähnlichen Diplotänstadium statt, nun auch als Diktyotän bezeichnet (BORUM, 1961).

Entscheidend für den Obergang der Keimzellen vom Diplotän in das Diktyotän scheint die Anlagerung der Follikelzellen zu sein (OHNO und SMITH, 1964). Nur durch den engen Kontakt der einschichtigen Lage von Follikelzellen mit Diktyotänoozyten scheint gewährleistet zu sein, daß die Oozyten keine vorzeitige Reifung durchlaufen und keine Degeneration eintritt.

In den ersten Wochen post partum durchlaufen die Oozyten eine Wachstumsphase, in der sie ihr Volumen um das 43fache vergrößern und einen Durchmesser von 70 µ erreichen (CHOUINARD, 1971). Zu diesem Zeitpunkt sind die Chromosomen extrem entspiralisiert, so daß sie auch elektronenmikroskopisch nicht mehr als solche erkennbar sind (TSUDA, 1965; CHOUINARD, 1973). Es wird angenommen (BAKER et al., 1969), daß die Chromosomen im Diktyotänstadium zu diesem Zeitpunkt eine im höchsten Grade diffuse

Lampenbürstenstruktur haben. Verbunden mit dem Wachstum der Oozyten läßt sich eine hohe r-RNA Synthese- und m-RNA Syntheseaktivität nachweisen (OAKBERG, 1968). Mit Ausbildung der Follikelhöhle endet die RNA-Synthese; die Oozyten verbleiben in diesem Ruhestadium mit geringer Syntheseaktivität und Metabolismus bis ins adulte Stadium kurz vor der Ovulation. Erst unter dem Einfluß gonadotroper Hormone reifen die Follikel zum Graafschen Follikel heran. Die Oozyten beenden erst wenige Stunden vor der Ovulation das Diktyotän und treten in die präovulatorische Phase ein.

Das erste sichtbare Zeichen des präovulatorischen Reifungsprozesses ist die Auflösung der Kernmembran. Dann beginnt sich das vorher zerstreute, kaum sichtbare Chromatin zu einer unregelmäßigen Chromatinmasse zu verdichten. In der darauf folgenden "transitional phase" werden die Bivalente sichtbar (KUHLMANN, 1970). Kurz darauf beginnt die Ausbildung der Spindel. Diese Prometaphase I Stadien werden innerhalb von drei Stunden durchlaufen.

In dieser, wie auch in den folgenden meiotischen Stadien, findet keine DNA Replikation statt. Mit Hilfe autoradiografischer Methoden konnte jedoch nachgewiesen werden, daß die Applikation von mutagenen Agentien die unscheduled DNA-Synthese während der ovulatorischen Phase der Meiose anregt, Repairprozesse also auch zu diesem Zeitpunkt der Oogenese ablaufen können (BRAZILL u. MASUI, 1978).

In der Metaphase I ist die Spindel ausgebildet und die Bivalente sind in der Äquatorialebene angeordnet. Wurde die Ovulation durch luteinisierende Hormone (z.B. human chorionic gonadotropin) induziert, so befinden sich die Oozyten für die Dauer von bis zu sechs Stunden im Metaphase I Stadium (EDWARDS und GATES, 1959).

In der frühen Anaphase I wird die Terminalisation abgeschlossen und die 20 Bivalente in jeweils zwei Univalente getrennt. Die Univalente bewegen sich nun mit ihrem Zentromerbereich voraus, zu den beiden entgegengesetzten Spindelpolen. Die beiden Chromatiden eines Univalentes sind zu diesem Zeitpunkt bereits bis auf das Zentromer voneinander getrennt. In der späten Anaphase I beginnt sich ein Mittelkörper durch Verdickung der Spindelfibrillen zu bilden.

In der sich anschließenden Telophase I erstreckt sich dieser Mittelkörper zwischen dem gebildeten ersten Polkörper und der Oozyte (KUHLMANN, 1970), womit die erste meiotische Teilung, die Reduktionsteilung, abgeschlossen wird. Unmittelbar danach geht die Oozyte ohne Interphase oder Prophase direkt in die Prometaphase der zweiten meiotischen Teilung über.

Das erste Stadium der Prometaphase II ist wieder charakterisiert durch das Auftreten der Chromatinmasse. In der "transitional phase II" bilden sich die Dyaden aus der Chromatinmasse heraus. Im Anschluß daran beginnt erneut die Ausbildung der Spindel. In der Metaphase II ordnen sich die Univalente in der Äquatorialebene an. Zu diesem Zeitpunkt, in einigen wenigen Fällen auch schon während der Prometaphase II, findet die Ovulation statt. Kommt es zu keiner Befruchtung, so bleibt das Metaphase II Stadium für mehrere Stunden bis zur Degenerierung der Oozyten erhalten. RÖHRBORN und HANSMANN (1971) konnten jedoch zeigen, daß auch unbefruchtete Eizellen einiger Mäusestämme eine Anaphase II und Telophase II ohne vorherige Befruchtung zu durchlaufen vermögen.

In der Regel kommt es zu einer Anaphase II, die innerhalb weniger Minuten abläuft, nur nach Eindringen des Spermiums. In der Telophase II wird wiederum ein Mittelkörper gebildet, der sich nun zwischen dem Ei und dem zweiten Polkörper erstreckt (KUHLMANN, 1970).

Im Pronukleus-Stadium wird die Kernmembran gebildet. Die Chromosomen sind durch Entspiralisierung in einen Interphasekern, den weiblichen Pronukleus übergegangen. Nach Bildung der Pronuklei, das heißt 10-12 Stunden nach der Befruchtung, findet die erste postmeiotische DNA-Replikation statt (SIRLIN u. EDWARDS, 1959).

In der Prophase der ersten meiotischen Teilung liegen beide haploiden Chromosomensätze zwar dicht beieinander, jedoch noch immer getrennt. Erst nach Ausbildung der Spindel und Anordnung beider haploider Chromosomensätze in der Äquatorialebene kommt es zur Karyogamie, womit die Befruchtung abgeschlossen ist und die Embryonalentwicklung eingeleitet wird.

Die Oogenese der Maus (nach KUHLMANN, 1970; verändert)

PRIMORDIALE KEIMZELLEN	im Dottersackepithelium		8.Tag p.c.
	Wanderung zu Gonaden u. mitotische Teilungen		9.-12.Tag p.c.
OOGONIEN	im Cortex der Gonaden		
	Vervielfachung durch mitotische Teilungen		12.-15.Tag p.c.
OOZYTEN			
	Dauer:	DNA-Synthese:	
prämeiotische S-Phase und G2	14 h	99,7% der repl. DNA-Synth.	13.-15.Tag p.c.
Leptotän	3 - 6 h		
Zygotän	12-40 h	0,3% der repl. DNA-Synth.	14.-15.Tag p.c.
Pachytän	60 h	unscheduled DNA	16.-18.Tag p.c.
Diplotän			19. - Geburt
- -			Geburt
Diktyotän			bis Tag der Ovulation
			Tag des Östrus um:
Prometaphase		unscheduled DNA	19-22 h
Metaphase I			22 - 1 h
Anaphase I			1 - 2 h
Telophase I			2 - 3 h
Prometaphase II			3 - 4 h
Metaphase II	Ovulation		
	Befruchtung		
ZYGOTE			
Anaphase II			
Telophase II Pronuklei			
	1. postmeiotische DNA-Replikation		
1. MITOSE			Tag nach der Befruchtung gegen 24 h

2.2. Die Oogenese des Syrischen Hamsters

Der aus Syrien stammende Goldhamster, Mesocricetus auratus, hat von allen Säugern eine der kürzesten intrauterinen Entwicklungszeiten (GRAVES, 1945). Obwohl die Implantation bei dieser Spezies erst am 5. Tag p.c. erfolgt, beträgt die Tragezeit nur ca. 16 Tage (GRAVES, 1945). Somit ist ein von der Maus zeitlich variierender Oogeneseverlauf zu erwarten, bei dem ja, wie beschrieben, die meiotischen Prophasestadien überwiegend synchron und vor der Geburt ablaufen.

Beim Syrischen Hamster erscheint das Primordium der Gonaden am 10. Tag p.c. als eine Verdickung des Keimzellenepitheliums (NAKANO, 1960). Auch am 11. Tag p.c. lassen sich Ovarien und Testes mit Hilfe morphologischer Kriterien noch nicht unterscheiden (LEMON u. MORTON, 1968; CHALLONER, 1974). Keimzellen kommen erst in geringer Zahl vor und können aufgrund ihres eosinophilen Zytoplasmas identifiziert werden. Sie sind gleichmäßig in den Gonaden verstreut und befinden sich zum überwiegenden Teil im Interphasestadium. Meiotische Figuren treten zu diesem Zeitpunkt niemals auf. Das Ovar bleibt morphologisch undifferenziert bis zum 15. Tag p.c., wenn Cluster von Oogonien von proliferierenden Stromaelementen umgeben werden. Mitotische Oogonienteilungen kommen verstärkt vor und erreichen ihr Maximum in den ersten Stunden nach der Geburt (NAKANO, 1960; LEMON u. MORTON, 1968; CHALLONER, 1974).

Sichtbarer Wechsel kommt im Ovar des Hamsters unmittelbar nach der Geburt vor. In Ovarien weiblicher Hamster, die 1-2 Stunden nach der Geburt getötet werden, finden sich erste Oozyten im Leptotänstadium (LEMON u. MORTON, 1968). Während der ersten 12 Stunden nach der Geburt nimmt die Zahl der Keimzellen, die sich im Leptotänstadium der ersten meiotischen Prophase befinden, rapide zu. Gleichzeitig sinkt die Zahl der Oogonien.

Die meisten Keimzellen sind 24 Stunden post partum (p.p.) in die erste meiotische Prophase eingetreten. Über 50% der gesamten Keimzellpopulation befindet sich dabei im Leptotänstadium. Zygotänstadien treten erstmals 12 Stunden p.p. auf. 66 Stunden p.p. befindet sich fast 1/3 aller Keimzellen im Zygotänstadium. Danach nimmt ihre Zahl rasch ab. Letzte Zygotänstadien finden sich am Morgen des 6. Tages p.p..

Am 4. Tag p.p. haben die meisten der Oozyten das Pachytänstadium erreicht. Erste Oozyten im Diplotänstadium werden am 5. Tag p.p., wenn die Mehrzahl der Zellen noch im Pachytänstadium ist, identifiziert. Oogonien werden in Ovarien dieses Alters nicht mehr gefunden (LEMON u. MORTON, 1968; CHALLONER, 1974). Mit diesen histologischen Befunden stimmen autoradiografische Untersuchungen überein (LEMON u. MORTON, 1968). Die prämeiotische DNA-Synthese in Keimzellen des Syrischen Hamsters ist auf die ersten 4 Tage nach der Geburt beschränkt.

Mit Obergang in das Diktyotän findet sowohl für die Oozyten als auch die primordialen Follikel eine Phase rapiden Wachstums statt. Am 8. Tag p.p. werden die mehr zentral gelegenen Oozyten von einer Lage schmaler, kubischer Zellen, den präsumptiven Granulosazellen, umgeben (GREENWALD u. PEPPLER, 1968). Am 13. Tag p.p. bestehen die Follikel aus zwei Zellagen, während sie am 16. Tag drei- bis fünfschichtig sind (CHALLONER, 1974). Erste spontane Ovulationen treten am 29. Tag auf.

3. Zytogenetische Untersuchungen an Oozyten von Säugern Literaturbefunde

Das Wissen über den Oogeneseverlauf ermöglichte es, Methoden zur Chromosomenpräparation aus Oozyten des Säugers zu entwickeln, Untersuchungen zum Non-disjunction Problem in Angriff zu nehmen, sowie die Wirkung von Mutagenen auf die Oogenese zu untersuchen.

Bereits 1953 gelang es RUNNER und PALM, bei Mäusen durch Injektion von Gonadotropin die Ovulation experimentell auszulösen. EDWARDS und GATES (1959) induzieren durch Gabe von "pregnant mare's serum" eine Superovulation, lösten durch Injektion von "human chorionic gonadotropin" die Ovulation aus und synchronisierten die meiotischen, sowie nach Verpaarung der hormonvorbehandelten Mäuse die mitotischen Stadien. Die Analyse der meiotischen Stadien erfolgte zunächst noch histologisch anhand von Schnittpräparaten. EDWARDS (1962) untersuchte dann Meiosestadien in Oozyten adulter Säuger (Maus, Ratte, Hamster, Affe) anhand von Quetschpräparaten. Für zytogenetische Untersuchungen war diese Präparationstechnik jedoch unbefriedigend, da keine optimale Chromosomenspreitung erreicht wurde. Bessere Resultate erzielte JAGIELLO (1965), der Natriumcitrat auf die Oozyten zur hypotonen Behandlung einwirken ließ, sie mit Eisessig fixierte und anschließend Quetschpräparate herstellte. Hierauf aufbauend entwickelte TARKOWSKI (1966) eine Lufttrockenmethode. Nach hypotoner Vorbehandlung werden die Oozyten durch tropfenweise Zugabe von Alkohol-Eisessig solange fixiert, bis ein Platzen der Oozyten auf dem Objektträger und somit auch ein Spreiten der Chromosomen erfolgt. Von RÜHRBORN und HANSMANN (1971) wurde diese Methode modifiziert und standardisiert, so daß sie als Mutagenitätstest Anwendung finden konnte. RODMAN (1971a) variierte die Methode, um Polkörperchromosomen untersuchen zu können. BASLER (1978) schließlich entwickelte eine Methode, um Metaphase I und Metaphase II Chromosomen des Goldhamsters untersuchen zu können. Bei all diesen Verfahren werden Oozyten aus den Ampullen der Eileiter präpariert, mit hypotoner Lösung behandelt und unter präparationsmikroskopischer Betrachtung einzeln auf Objektträger übertragen und fixiert.

Durch diese Präparationstechnik, nämlich die Fixierung einzelner Zellen, ist sichergestellt, daß das Auftreten von Hyperploidien auf Non-disjunction Prozesse zurückzuführen ist und überzählige

Chromosomen nicht von benachbarten Metaphasen stammen. Somit erwies sich diese Methode als geeignet zur Analyse von Non-disjunction Prozessen beim Säuger. In ersten Untersuchungen wurde die spontane Non-disjunction Rate bei verschiedenen Maus- (RÜHRBORN, 1972; 1975; BECKER u. SCHÜNEICH, 1977; HANSMANN, 1978) und Hamster-Spezies (HANSMANN et al., 1974; BASLER, 1978; HANSMANN u. PROBECK, 1979a) untersucht (Tab. 16, S. 104). Gleichzeitig wurde auch begonnen, nach Ursachen der Aneuploidienentstehung zu suchen.

Aufgrund von Untersuchungen an Metaphase II Oozyten der Maus wurde eine postovulatorische Alterung von Oozyten als mögliche Ursache für Non-disjunction Prozesse angesehen (RODMAN, 1971b). Werden die von den Coronazellen umgebenen Oozyten aus den Ampullen der Ovarien präpariert und zytologisch aufgearbeitet, so sind die Schwesterchromatiden im Metaphase II Stadium noch durch das Zentromer verbunden. Eine Trennung der Schwesterchromatiden, der Obergang in die Anaphase II, findet allerdings wenige Stunden später statt (RÜHRBORN u. HANSMANN, 1971; RODMAN, 1971b). Es wurde vermutet (RODMAN, 1971b), daß eine Befruchtung solchermaßen postovulatorisch gealterter Oozyten zu Aneuploidien führen würde. Analysen der ersten mitotischen Teilung bestätigten diese Vermutung jedoch nicht (DONAHUE u. KARP, 1973); Trisomien traten nicht auf.

HENDERSON und EDWARDS (1968), LUTHARDT et al. (1973), JAGIELLO et al. (1974), sowie SPEED (1977) analysierten in Metaphase I Oozyten verschiedener Säuger-Spezies (Kuh, Schaf, Maus) die Chiasmata-Frequenz. Dabei beobachteten sie, daß mit zunehmendem Alter der weiblichen Säuger die Chiasmata-Frequenz absank, die Zahl der Univalente im Metaphase I Stadium hingegen anstieg. Bereits HENDERSON und EDWARDS (1968) vermuteten daher, daß mit sinkender Chiasmata-Frequenz und steigender Zahl Univalente es zu einer vermehrten Fehlverteilung der Chromosomen in der Anaphase I kommen müßte. Die Folge davon wären aneuploide Metaphasen II und nach einer Befruchtung schließlich Trisomien tragende Embryonen. RÜHRBORN (1972,1975), MARTIN et al. (1976) sowie CHEBOTAR (1976a,b, 1978) gelang es dann, durch Analysen von Metaphase II Oozyten nachzuweisen, daß mit zunehmendem Alter weiblicher Nager tatsächlich die in Metaphase I vermehrt vorkommenden Univalente zu Hyperploidien im Metaphase II Stadium führen.

Neben Untersuchungen zum Non-disjunction Problem wurde bereits in ersten Arbeiten auch die Reliabilität der Methode zur Analyse von induzierten strukturellen Aberrationen und zur Stadiensensibilität von Oogonien und Oozyten untersucht. Entsprechend dem allgemeinen Trend auf dem Gebiet der Mutagenese wurde ein Großteil dieser Untersuchungen nach Exposition weiblicher Säuger mit Röntgenstrahlen durchgeführt.

In diesen Untersuchungen erfolgte die Analyse auf Chromosomenaberrationen sowohl nach Exposition pränataler Stadien der Oogenese (BATRA u. KALRA 1974; TSUCHIDA u. UCHIDA, 1974b; HANSMANN et al., 1975b), während der ersten postnatalen Wochen (SLIZYNSKI, 1969; HANSMANN, 1974; BREWEN et al., 1976; SEARLE u. BEECHY, 1974) sowie während der präovulatorischen Phase (GILLIAVOD u. LEONARD, 1973, 1974; YAMAMOTO et. al., 1973; GOSDEN u. WALTERS, 1974; UCHIDA u. LEE, 1974; REICHERT et al., 1975a,b; BREWEN et al., 1976, 1977; UCHIDA u. FREEMANN, 1977; ADLER et al., 1977; HANSMANN u. PROBECK, 1979b). Hierbei zeigte sich, daß Röntgenstrahlen sowohl strukturelle Chromosomenaberrationen als auch Aneuploidien zu induzieren vermögen. Desweiteren ergibt ein Vergleich der verschiedenen Resultate, daß Stadiensensibilitäten bestehen, wobei sich besonders die präovulatorische Phase am sensibelsten erwies.

Neben diesen Arbeiten auf dem Gebiet der Strahlenmutagenese wurde auch begonnen, die Wirkung von Chemikalien auf die Oogenese des Säugers zu untersuchen, wobei zu den ersten in diesem Test eingesetzten Chemikalien Streptonigrin (JAGIELLO,1967) Phleomycin (JAGIELLO, 1968) und Actinomycin D (JAGIELLO, 1969) gehören. RÖHRBORN und HANSMANN (9171) setzten zunächst die als mutagen bekannten Chemikalien Trenimon, Cyclophosphamid und Methotrexat ein und analysierten Oozyten der Maus im Metaphase II Stadium. In weiteren Untersuchungen wurde von ihnen (HANSMANN et al., 1974) der Chinesische Hamster als Versuchstier in die Untersuchungen mit einbezogen. Da sich in diesen Untersuchungen mit chemischen Mutagenen entsprechend den Untersuchungen in der Strahlenmutagenese die Reliabilität und Sensitivität des Oozytentestes erwies, fand diese Methode ihre Anwendung auch in der Mutagenitätsprüfung. Im Gegensatz zu Untersuchungen an Chromosomen somatischer Gewebe liegen jedoch bisher nur wenige Befunde an Metaphase I und Metaphase II Oozyten des Säugers vor.

So wurden mit diesem Testsystem u.a. orale Kontrazeptiva untersucht (RÖHRBORN u. HANSMANN, 1974; JAGIELLO u. LIN, 1974). Die potentielle Mutagenität des Schwermetalls Cadmium prüften SHIMADA (1975, 1976), SHIMADA et al. (1977) und WATANABE et al. (1977, 1979). Verschiedene Quecksilberverbindungen wurden von JAGIELLO und LIN (1973) eingesetzt, desweiteren Na_2SO_3 (JAGIELLO et al., 1975). Getestet wurden auch die Kohlenwasserstoffe Benzol (RÖHRBORN u. BASLER, 1977a), Anthrazen, Benzo(a)pyren, Chrysen und Phenanthren (BASLER et al., 1976, 1977b, 1978). Als nicht strukturelle Chromosomenaberrationen induzierend erwiesen sich Alkohol (SEITE, 1978), der Transquillizer Mepromat (JAGIELLO et al., 1973) sowie das Tuberkulosemittel Isoniazid (RÖHRBORN et al., 1978).

Keine Einheitlichkeit hinsichtlich mutagener Wirkung weisen alkylierende Agentien in diesem Testsystem auf:

Das Zytostatikum Cyclophosphamid erwies sich als hochmutagen sowohl in Oozyten der Maus (RÖHRBORN u. HANSMANN, 1971) als auch auf Chromosomen des Knochenmarks Chinesischer Hamster, der Maus und der Ratte (RÖHRBORN u. BASLER, 1977b). Ebenso vermag Trenimon sowohl in somatisch sich teilenden Zellen (SCHMID et al., 1971) als auch in Metaphase II Oozyten (RÖHRBORN u. HANSMANN, 1971) Chromosomenaberrationen zu induzieren.

Isopropylmethansulfonat induziert in hohem Maße dominante Letalmutationen (GENEROSO et al., 1971). In Metaphase I Oozyten der Maus ließen sich nach Applikation gleich hoher Dosen von Isopropylmethansulfonat jedoch nur vergleichsweise wenige abnormale Zellen finden (CAINE u. LYON, 1977). Desweiteren unterschieden sich die analysierten Typen der Chromosomenaberrationen im Vergleich zu Trenimon-induzierten. Isopropylmethansulfonat induzierte fast ausschließlich Gaps, Brüche und Fragmente; unter 200 analysierten Oozyten wurde nur ein einziger Chromatideninterchange gefunden (CAINE u. LYON, 1977). Cyclophosphamid und Trenimon hingegen induzierten neben Brüchen und Fragmenten auch Exchangefiguren und Aneuploidien.

Busulfan schließlich erwies sich als nicht mutagen im Oozyten-Test (BASLER et al., 1979), induzierte jedoch in hohem Maße sowohl dominante Letalmutationen (GENEROSO et al., 1971) als auch strukturelle Chromosomenaberrationen in mitotisch sich teilenden Zellen (BASLER et al., 1979).

Vergleichbare Befunde wurden mit Triäthylenmelanin (TEM) und Methylmethansulfonat (MMS) erzielt. Beide alkylierenden Substanzen induzieren keine strukturellen Chromosomenaberrationen in Metaphase I Oozyten der Maus (BREWEN u. PAYNE, 1976, 1978). Auch in Metaphase II Oozyten wurden nach Behandlung der Mäuse mit MMS keine strukturellen Aberrationen oder Aneuploidien gefunden (BASLER, unpubl.). In Zygotenstadien (1. mitotische Teilung) hingegen fanden sich sowohl nach Behandlung der Muttertiere mit MMS (BREWEN u. PAYNE, 1976) als auch mit TEM (BREWEN u. PAYNE, 1978) ein hoher Prozentsatz an Metaphasen mit Aberrationen.

Die Untersuchungen mit alkylierenden Agentien verstärken den Verdacht, daß auch verschiedene Stadien der Oogenese unterschiedlich sensibel auf chemische Mutagene reagieren. Der Forderung GENEROSOs (1973), nicht nur die präovulatorische Phase der Oogenese mit in die Analysen einzubeziehen, wurde nur vereinzelt nachgekommen (HANSMANN, 1974; REICHERT et al., 1975b). Weitere Untersuchungen wären somit wünschenswert, um Aussagen zur Stadiensensibilität machen zu können.

Parallel zu Untersuchungen an Chromosomen im Metaphase I und Metaphase II Stadium wurde begonnen, zytogenetisch die Auswirkungen der in Oozyten spontan auftretenden oder chemisch induzierten Mutationen auf die Embryonalentwicklung zu untersuchen. DONAHUE (1972a) analysierte Eier von CFI-Mäusen, die 12 bis 36 h zuvor nach HCG Injektion verpaart worden waren. Pronuklei fanden sich erstmals 16 h nach der HCG Applikation. Metaphasen der ersten mitotischen Teilungen waren zwischen der 28. und 30. Stunde nach der HCG-Injektion analysierbar. Die Häufigkeit spontan auftretender Chromosomenaberrationen war äußerst gering (DONAHUE, 1972b). Nur 1,8% der analysierten Metaphasen waren hypoploid. Ebenso traten Trisomien in dieser Studie, wie auch in Untersuchungen von FRASER und MAUDLIN (1979) an fünf verschiedenen Mäusestämmen, immer in weniger als 1,3% der Fälle auf.

RÖHRBORN et al. analysierten bereits 1971 präimplantative Mäuseembryonen im Zwei-Zell Stadium, deren Muttertiere kurz vor der Verpaarung mit Trenimon behandelt worden waren. HANSMANN (1973) testete Amethopterin und arbeitete neben Pronuklei der Oozyten und Zwei-Zell Stadien auch Morulae auf. Hier-

bei wurde festgestellt, daß bereits während der frühen präimplantativen Embryogenese eine Elimination von Chromosomenaberrationen stattfindet. SHAVER (1975) wies jedoch nach, daß zum Zeitpunkt der Implantation die Häufigkeit von Blastozysten mit Chromosomenaberrationen noch deutlicher gegenüber Kontrollen erhöht ist. BASLER et al. (1976) beschränkten die Untersuchungen nicht nur auf präimplantative Stadien, sondern bezogen auch 9,5 und 16,5 Tage alte Embryonen in die zytogenetischen Analysen mit ein.

Aufgrund dieser wenigen und zum Teil widersprüchlichen Untersuchungen ist es bisher nicht möglich, allgemeingültige Aussagen über die Chromosomenaberrationen induzierende Wirkung in Oozyten durch Chemikalien zu machen.

4. Alkylierende Agentien

Alkylantien, denen auch die ersten entdeckten chemischen Mutagene angehören (AUERBACH, 1943; AUERBACH u. ROBSON, 1944), zählen heute zu den am eingehendsten untersuchten Mutagenen. Diese Verbindungen zeigen nach bisherigen Untersuchungen an somatischen Zellen eine recht weitgehende Einheitlichkeit hinsichtlich ihrer chemischen Reaktivität und biologischen Aktivität. Ihre mutagene Wirksamkeit wird in fast allen durchgeführten Tests an den unterschiedlichsten Testorganismen bestätigt.

Die alkylierenden Agentien gehören auch zu den wenigen Stoffen, bei denen begonnen wurde, die mutagenen Wirkmechanismen zu untersuchen. Sie produzieren unter physiologischen Bedingungen hochreaktive elektrophile Carbonium-Ionen, die mit nukleophilen Strukturen der Zelle reagieren können. Als bedeutsame Reaktionspartner kommen dabei sowohl Proteine (Carboxyl-, Sulfhydryl- und terminale α-Aminogruppen) als auch neben der RNA die DNA (Phosphoribosylgruppen, aromatische Aminogruppen der Basen) in Frage. In der DNA ist Guanin die bevorzugte alkylierte Base. Dabei erfolgt die Alkylierung insbesondere in N-7-Position des Guanins, seltener auch am Stickstoff des Adenins in Position 1 und 3 (BAUTZ u. FREESE, 1960), sowie dem N-1 des Cytosins. Durch die Alkylierung des Guanins entsteht 7-Alkylguanin, das hydrolytisch von der DNA gelöst werden kann. Als Folge davon kann in der unstabilen, weil depurinierten DNA ein Bruch eintreten.

Weitere Arbeiten (ELMORE et al., 1948; RENIER u. ZAMENHOF, 1957; ROSS, 1953, 1958, 1962; STACEY et al., 1958) lassen vermuten, daß ähnliche Reaktionen durch Alkylierung der Phosphoribosylgruppen der DNA ablaufen. Es wird angenommen, daß der gebildete instabile Triester durch Abspaltung der Alkylgruppen stabilisiert wird, wodurch Brüche zwischen Phosphat und Desoxyribose entstehen können (RÖHRBORN, 1970a). Wirken anstelle monoalkylierender Alkylantien polyfunktionelle Verbindungen auf die reaktiven Gruppen der DNA, können, wenn auch in geringerem Maß, Diguanin-alkylprodukte entstehen. Die werden durch Vernetzung (Crosslinks) z.B. zwischen N-7 Atomen gegenüberliegender Guaninbasen gebildet (BROOKES u. LAWLEY, 1961). Diese kovalenten Bindungen zwischen dem Alkylans und zwei Basen der

komplementären Stränge dürften die Replikation der DNA hemmen und bedeutsam sein bei der Entstehung struktureller Chromosomenaberrationen.

Wegen ihrer bekannten mutagenen Eigenschaften werden Alkylantien heutzutage bei der Testung von Chemikalien als Positivkontrolle eingesetzt. Desweiteren dienen sie als Eichsubstanz zur Erprobung neu entwickelter Testsysteme. Schließlich werden sie als Standardmutagen in der Grundlagenforschung verwendet.

Auch in der vorliegenden Arbeit sollen Alkylantien eingesetzt werden, und zwar die Zytostatika Trenimon und Mitomycin C. Eine nähere Beschreibung der physiko-chemischen Eigenschaften beider Stoffe, ihre Wirkmechanismen und bisher vorliegende zytogenetische Mutagenitätsbefunde werden im folgenden beschrieben.

4.1. Trenimon

4.1.1. Physiko-chemische Beschreibung

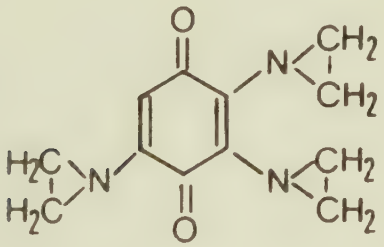
2,3,5-Tris-äthylenimino-benzochinon-(1,4) (=Triaziquon, Trenimon) wurde 1958 erstmals von GAUSS synthetisiert. Dieses dunkel-violette Kristall, mit einem Schmelzpunkt von 159-162°C, besitzt ein Molekulargewicht von 231,2. Die mikroskopisch feinen Kristallnadeln sind bei Raumtemperatur löslich. Nähere Angaben über Synthese (Abb.1), Struktur (Abb.2) und Entwicklung finden sich bei GAUSS und PETERSEN (1958, 1963).

2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon | Aziridin (Äthylenimin) | Triaziquon

Abb.1: Synthese von Triaziquon (=Trenimon)

Daten über die Toxizität wurden an der Ratte erhoben. Die LD_{50} nach einmaliger intraperitonealer Injektion und 14-tägiger Beobachtungszeit liegt bei 0,5 mg/kg (BAYER, 1972).

Triaziquon wurde ab 1961 von der BAYER AG Leverkusen synthetisiert und unter dem Handelsnamen Trenimon vertrieben. Zu Beginn der Krebs-Chemotherapie war Trenimon in Deutschland eines der gebräuchlichsten Zytostatika, das aber mittlerweile durch andere ersetzt wurde und heute nicht mehr als Arzneimittel im Handel ist.

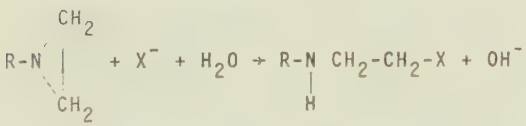


Trenimon

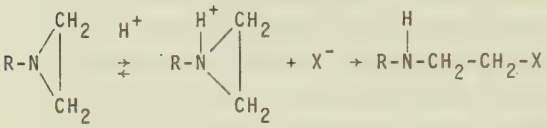
Abb.2: Struktur von Trenimon

4.1.2. Wirkungsmechanismus

Trenimon gehört zu den polyfunktionellen Alkylantien, die in der Lage sind, unter physiologischen Bedingungen nukleophile Gruppen zu alkylieren. Nach Öffnung des Äthyleniminrings kann eine Reaktion mit einer elektronendichten Gruppe (z.B. -SH, -OH oder $-NH_2$) in folgender Weise erfolgen (LINFORD, 1973), wobei X^- die nukleophile Gruppe darstellt:



Eine weitere Möglichkeit, durch die der Ring gebrochen werden kann, ist eine säure-katalysierte Reaktion, die zu einem protonierten Zwischenprodukt führt (LINFORD, 1973):



Als weitere Möglichkeit wird eine Reaktion unter Bildung hochreaktiver elektrophiler Carbonium-Ionen diskutiert (KHAN u. ROSS, 1969).

4.1.3. Induktion von Chromosomenaberrationen

Die Alkylierung nukleophiler Strukturen der Zelle durch das polyfunktionelle Agens Trenimon führt sowohl zur Induktion von Punktmutationen, als auch von Chromosomenaberrationen, wie 1965 von LOERS und RÜHRBORN an Drosophila erstmals nachgewiesen wurde. Mit fast allen bisher verwendeten Testsystemen konnte die starke mutagene Wirkung des Zytostatikums aufgezeigt werden (ausführliche Darstellung und Literaturangaben s. OBE u. BEEK, 1979).

So analysierten NICOLOFF und GECHEFF (1968) Trenimon-induzierte Chromosomenaberrationen in meristematischen Geweben der Gerste. Analysiert wurde die erste nach der Mutagenbehandlung der Gerstensamen sich anschließenden Mitose. Gefunden wurden ausschließlich Aberrationen vom Chromatidtyp. Desweiteren ergaben die Untersuchungen, daß die intrachromosomale Verteilung der induzierten Brüche, Deletionen, Duplikationen und Chromatidtranslokationen nicht-randomisiert vorlag, sondern die Zentromerregion und sekundäre Konstriktionen bevorzugt involviert waren.

Rieger et al. (1973) behandelten Vicia faba Wurzelspitzen mit Trenimon und konnten aufzeigen, daß Interchange zwischen homologen Chromosomen gehäuft auftraten. Die Autoren schlossen daraus auf eine somatische Paarung homologer Chromosomen während der Interphase.

OBE (1971) untersuchte die mutagene Wirkung verschiedener Äthylenimine auf Vicia faba Chromosomen. Dabei wies er nach, wie zuvor LÖERS und RÜHRBORN (1965) bei Drosophila, daß die Häufigkeit der induzierten Aberrationen vom monoalkylierenden zum polyfunktionellen alkylierenden Mutagen anstieg. Zurückzuführen sein dürfte dies auf die Häufigkeit auftretender Crosslinks, die nur von polyfunktionellen Alkylantien induziert werden.

KAUFMANN et al. (1973) bestimmte den Schwellenwert für klastogene Effekte durch Trenimon auf menschliche Leukozyten in vitro. Konzentrationen unter $2{,}8 \times 10^{-10}$M erhöhten die Häufigkeit aberranter Zellen, also auch den Anteil achromatischer Läsionen und Chromatidbrüche nicht.

HAMPEL et al. (1966) fanden, daß der Prozentsatz an Metaphasen mit Chromosomenaberrationen in einer exponentiellen Dosisabhängigkeit ansteigt. Eine Analyse einzelner Aberrationstypen ergab (SPERLING et al., 1972), daß im unteren Dosisbereich die Häufigkeit an Gaps, Chromatidbrüchen und Isochromatidbrüchen linear mit der Dosis ansteigt. Chromatidentranslokationen hingegen zeigen ein anderes Verhalten hinsichtlich der Dosis-Effekt-Beziehugen. Der Prozentsatz steigt mit höheren Dosen exponentiell an und die Dosis-Effekt-Kurve weist keine Sättigung auf.

Vergleichbar den Befunden an Vicia faba waren die inter- und intrachromosomalen Verteilungen der von Trenimon in Lymphozyten induzierten Aberrationen. Eine nicht-randomisierte Verteilung wurde beschrieben (GEBHART, 1971; GEBHART u. BAUER, 1970; HAMPEL, 1968; HAMPEL u. STOPIK, 1971; HAMPEL et al., 1966; SPERLING, 1968; STOPIK, 1971). Auch traten wiederum Translokationen zwischen homologen Chromosomen auffallend oft auf (GEBHART u. BAUER, 1970).

Befunde zur Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen am Säuger in vivo wurden fast ausschließlich am Chinesischen Hamster (Cricetulus griseus) erhoben.

MATTER (1976) setzte den Chinesischen Hamster als Versuchstier ein. Als geringste effektive Dosis für die Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen in Metaphasen des

Knochenmarks nach zweimaliger Injektion im 24 h Abstand wurden 0,031 mg/kg ermittelt. MATTER (1976), wie zuvor SCHMID et al. (1971), wies Dosis-Effekt-Beziehungen nach. Desweiteren zeigten SCHMID et al. (1971) auf, daß die intraperitoneale Injektion von Trenimon sich als effektiver erwies als die orale Gabe. Von großer Bedeutung erwies sich auch die Aufarbeitungszeit. Das Maximum an Zellen mit Aberrationen wurde 6-8 h nach der zweiten Injektion gefunden. Bei einer späteren Aufarbeitungszeit wurde eine Selektion von geschädigten Zellen beobachtet. In vergleichbaren Untersuchungen mit Ratten erwies sich eine Aufarbeitung 48 h nach einmaliger Injektion am effektivsten (MARIONE u. VENTURELLI, 1970).

Erste Untersuchungen zur Induktion von Chromosomenaberrationen in männlichen Keimzellen durch Trenimon führte SCHLEIERMACHER (1966a,b) durch. In dieser, wie auch in vergleichbaren späteren Arbeiten (SCHLEIERMACHER, 1969, 1970), wurden männliche Mäuse mit Einzelinjektionen von bis zu 0,3 mg Trenimon/kg behandelt. Die Versuchstiere wurden zwischen dem 1. und dem 34. Tag nach der Injektion der Testsubstanz getötet, die Keimzellen aufgearbeitet und Diakinesestadien analysiert. Durch diese Versuchsanordnung wurden Keimzellen analysiert, die entweder im Diplotän (Behandlung am Tag vor der Analyse), Pachytän (2-8 Tage), Leptotän (11 Tage), Preleptotän (12 Tage) oder im Spermatogonienstadium verschiedenen Alters (19-34 Tage und mehr) behandelt wurden. Die Trenimon Behandlung führte in allen Stadien der Spermatogenese zum vermehrten Auftreten von Univalenten. Strukturelle Chromosomenaberrationen wurden vergleichsweise wenig (SCHLEIERMACHER, 1966a,b) oder gar nicht (VOGEL et al., 1971; SCHLEIERMACHER, 1970) gefunden.

LEONARD (1973, 1976), sowie LEONARD und LINDEN (1972) analysierten Spermatozyten im Diakinese/Metaphase I Stadium 100 Tage nachdem männlichen Mäusen 0,2 mg Trenimon/kg injiziert worden war. Hierbei bestätigten sich die negativen Befunde von SCHLEIERMACHER; es wurden praktisch keine Aberrationen gefunden.

In postspermatogonialen Stadien hingegen wurden nachweisbar strukturelle Aberrationen induziert (SCHMID u. BINKERT, 1973; BINKERT u. SCHMID, 1977). Nach Behandlung männlicher Chinesischer Hamster mit Trenimon und Verpaarung mit unbehandelten

Weibchen wurden präimplantative Embryonen (2 bis 8-Zell-Stadien) aufgearbeitet. Während die Häufigkeit der numerischen Aberrationen im Kontrollbereich lag, wiesen bis zu 23% aller Embryonen (Kontrolle 1,8%) strukturelle Aberrationen (Deletionen, dizentrische Chromosomen, Translokationen, Inversionen, Ringchromosomen) auf.

Sowohl strukturelle Aberrationen, als auch numerische, ließen sich in weiblichen Keimzellen (Metaphase II Oozyten) von Mäusen nachweisen, denen in der präovulatorischen Phase 0,25 bis 1 mg Trenimon/kg injiziert worden war (RÖHRBORN u. HANSMANN, 1971). Vergleichbare Experimente wurden mit dem Chinesischen Hamster durchgeführt, der sich jedoch als weniger sensibel erwies (HANSMANN et al., 1974, 1975a).

In weiteren Untersuchungen mit Mäusen (HANSMANN u. RÖHRBORN, 1973a,b) wurden analog den Versuchen zur Stadiensensitivität in der Spermatogenese (s.o.), verschiedene Stadien der Oogenese mit Trenimon behandelt und die weiblichen Keimzellen im Metaphase II Stadium analysiert. Für dieses chemische Agens erwiesen sich im Hinblick auf die Induktion von Chromosomenaberrationen Oogonien und die Oozyten in der präovulatorischen Phase am sensibelsten.

In weiteren Untersuchungen wurden weibliche Mäuse in der präovulatorischen Phase mit Trenimon behandelt und anschließend mit unbehandelten Männchen verpaart, um die Auswirkung auf verschiedene Stadien der Embryogenese zu untersuchen. Begonnen wurden diese Untersuchungen von RÖHRBORN et al. (1971), die 2- und 4-Zell-Stadien analysierten. In späteren Arbeiten wurde die Elimination dieser Chromosomenaberrationen, die in Oozyten induziert und in 2- und 4-Zell-Stadien analysierbar waren, im weiteren Verlauf der Embryogenese analysiert (RÖHRBORN u. HANSMANN, 1973; HANSMANN u. RÖHRBORN,1973a; BUSELMAIER u. HANSMANN, 1975; BASLER et al., 1976).

Obwohl Trenimon zu den am besten untersuchten chemischen Agentien hinsichtlich der mutagenen Wirkung zählt, sind die Mechanismen unbekannt, die zu unterschiedlichen Reaktionen männlicher und weiblicher Keimzellen auf das Mutagen führen. Widersprüchlich sind desweiteren die an somatischen Zellen und Oozyten erhobenen Befunde. Die Untersuchungen an Chromo-

somen des Knochenmarks (s.o.) lassen darauf schließen, daß Trenimon zu den Stoffen mit einem "delayed effect" gehört, das heißt, daß die induzierten Mutationen erst nach erfolgter DNA Replikation in der S Phase eines Zellzyklusses in strukturelle Aberrationen transformiert werden. Die an Oozyten erhobenen Befunde zeigen jedoch, daß daneben auch andere Mechanismen wirksam sein müssen, die nach erfolgter Alkylierung unmittelbar zu Bruchereignissen führen.

4.2. Mitomycin C

4.2.1. Physiko-chemikalische Beschreibung

Azirino (2´, 3´,:3,4) Pyrolol (1,2-a) Indolole-4,7-Dione, 6-Amino.1,1a, 2,8 8a,8b-Hexahydro-8-(Hydroxymethyl)-8a-Methoxy-5-Methyl-, Carbamat (ester) mit einem Molekulargewicht von 344,33 (ARORA, 1979) wurde 1956 von HATA et al. erstmals aus Streptomyces caespitosus isoliert. Es wird als blau-violettes Kristall mit einem Schmelzpunkt von 360°C beschrieben, das sowohl in Wasser als auch in polaren Lösungsmitteln löslich ist.

Daten über die Toxizität wurden an der Maus erhoben. Die LD_{50} nach intraperitonealer Injektion beträgt 8 mg/kg (DHEW, 1979). Hergestellt und vertrieben wird es von der Kyowa Hako Kogyo Co., Ltd Toxyo, Japan unter dem Handelsnamen Mitomycin C.

Nähere Angaben über Struktur (Abb.3) und Synthese finden sich bei KIRSCH (1967).

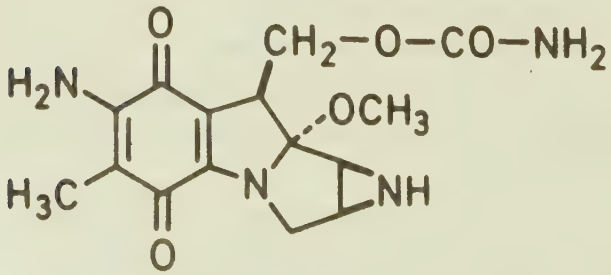


Abb.3: Struktur von Mitomycin C

4.2.2. Wirkungsmechanismus

Schon in einer der ersten Untersuchungen mit Mitomycin C konnten SHIBA et al. (1959) die spezifische DNA-Synthese hemmende Wirkung des Antibiotikums zeigen. Während die RNA- und Proteinsynthese weiterhin abläuft, wird die DNA-Synthese in Gegenwart von Mitomycin C geblockt. Die inhibitorische Wirkung von Mitomycin C wird auch dann aufrechterhalten, wenn die Zellen anschließend in ein Mitomycin freies Medium übertragen und gewaschen werden.

Es wurde vermutet (SCHWARTZ et al., 1963), daß die chemisch-biologischen Eigenschaften auf eine Alkylierung zurückzuführen seien. IYER und SZYBALSKI (1963) postulierten, daß der Mechanismus von Mitomycin C ein Cross-linking der komplementären DNA Stränge sei , zurückzuführen auf kovalente Bindungen zwischen dem Antibiotikum und der DNA. Der Nachweis für das Vorhandensein von Crosslinks wurde in einem Versuch demonstriert, in dem DNA in Gegenwart von Mitomycin C auf 100°C erhitzt und anschließend schnell auf 0°C abgekühlt wurde. Die DNA von Mitomycin C behandelten Zellen verbleibt in ihrer Doppelstrangform im Gegensatz zu Einzelsträngen der unbehandelten Zellen (Abb. 4).

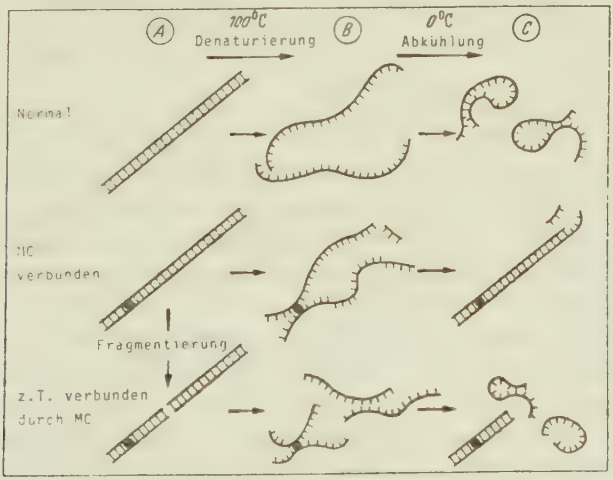


Abb.4: Nachweis Mitomycin C (MC) induzierter Crosslinks. DNA ohne und mit Crosslinks zum Zeitpunkt vor (A) und nach Denaturierung durch Erhitzung auf 100°C (B) und Abkühlung (C) auf 0°C (nach IYER u. SZYBALSKI, 1963).

Da Mitomycin C in seiner normalen oxidierten Form in vitro nicht mit gereinigter DNA reagiert, wird angenommen, daß eine metabolische Aktivierung der Alkylierung und Bildung von Crosslinks vorausgehen muß (SZYBALKI u. IYER, 1964; WARING, 1968). Es wird vermutet, daß die Reduktion des Mitomycin C Moleküls zum Hydrochinon-Derivat in vivo in Gegenwart einer NADPH-abhängigen Chinon-Reduktase abläuft (Abb.5).

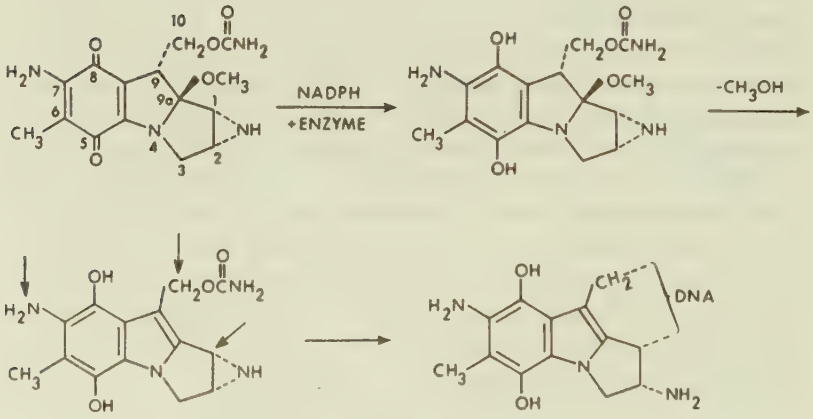


Abb.5: Mitomycin C vor und nach chemisch-enzymatischer Reduktion. Die Pfeile weisen auf die möglichen reaktiven Stellen des bifunktionellen Agens (nach SZYBALKI u. IYER, 1967; aus LOWN, 1979).

Unter mehreren getesteten Bakterien-DNAs (SZYBALSKI u. IYER, 1964) wurden in Sarcinia lutea DNA, die zu 70% Guanin-Cytosin enthält, am häufigsten Crosslinks gefunden. Die wenigsten fanden sich in Cytophaga johansonii DNA, die nur zu 32% Guanin-Cytosin Basen aufweist. LOWN et al. (1976) konnten nachweisen, daß die Häufigkeit induzierter Crosslinks linear mit dem Guanin-Cytosin Anteil der DNA zunimmt. Aufgrund dieser Untersuchungen

kann geschlossen werden, daß Guanin, oder Cytosin, oder beide die bevorzugten Orte der Alkylierung durch Mitomycin C sind. ARORA (1979) beschreibt für diese Interaktion folgende zwei Möglichkeiten: a) Die Alkylierung erfolgt in benachbarten GC Basenpaaren, und zwar jeweils am O6 des Guanins. Der Abstand zwischen beiden O6 der Guanine beträgt 3,0 Å. Das entspricht in etwa dem Abstand von 2,9 Å zwischen dem C1 des Acridins und dem C10 der Carbamat-Gruppe, den reaktiven Stellen des Mitomycin C. b) Aufgrund der molekularen Struktur wäre es auch möglich, daß der primäre Prozeß eine Interkalierung ist. Eine kovalente Bindung erfolgt danach durch das reduzierte Mitomycin C Molekül, und zwar durch C10 des Carbamats und N2 des Aminobenzochinons.

Weitere Untersuchungen von LOWN (1979) lassen darauf schließen, daß Mitomycin C neben der Induktion von Crosslinks auch monoalkylierend und depurinierend wirken kann (Abb.6).

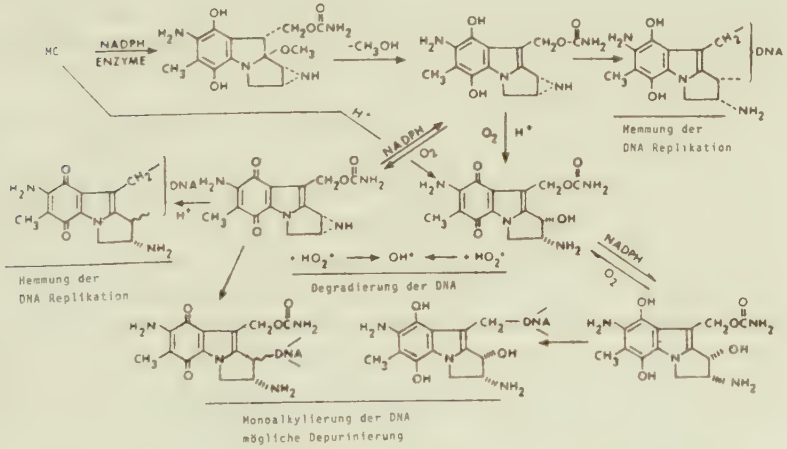


Abb.6: Die monoalkylierende, Crosslinks induzierende und depurinierende Wirkung von Mitomycin C (MC) (nach LOWN, 1979).

4.2.3. Induktion von Chromosomenaberrationen

Die Alkylierung der DNA, entweder monofunktionell oder bifunktionell, unter Entstehung von Crosslinks (IYER u. SZYBALSKI, 1963; WEISSBACH u. LISIO, 1965) wirkt sich mitosehemmend, zytotoxisch und mutagen aus. Die Mutagenität war, ähnlich wie bei Trenimon, in allen bisher untersuchten Testsystemen und Organismen nachweisbar. Da auch über Mitomycin C eine neuere Obersichtsarbeit vorliegt (VIG, 1977), sei wiederum nur auf solche Arbeiten eingegangen, die zum Mutagenitätsverständnis der Substanz wesentlich beitragen und auf Mutagenitätsuntersuchungen am Säuger in vivo.

Erste Untersuchungen zur Induktion von Chromosomenaberrationen durch Mitomycin C wurden von MERZ (1961) an Vicia faba erhoben. Diese und weitere Untersuchungen an Vicia ergaben, daß die strukturellen Aberrationen nicht-randomisiert vorkommen, sondern überwiegend in den heterochromatischen Abschnitten lokalisiert sind (ARORA et al., 1969; RAO a. NATARAJAN, 1967; RIEGER et al., 1975). RAO und NATARAJAN (1967) vermuten, daß die Brüche sich in den G-C reichen Regionen der Chromosomen ereignen. Indizien hierfür sind, daß die von Äthyl-Methansulfonat (das Guanin alkyliert) und Hydroxylamin (das Cytosin angreift) induzierten Bruchstellen sich mit denen von Mitomycin C überlappen (NATARAJAN u. UPADHYA, 1964).

Weitere Untersuchungen an verschiedenen Mäusestämmen (NATARAJAN u. RAPOSA, 1975) und Chinesischen Hamster Zellkulturen (NATARAJAN u. SCHMID, 1971) bestätigen die an Vicia faba erhobenen Befunde, daß heterochromatische Abschnitte Orte der von Mitomycin C induzierten Mutationen sind. In Organismen mit fehlendem sichtbaren Heterochromatin oder mit heterochromatinarmen Chromosomen wurden entsprechend auch keine, oder nur wenige Brüche induziert, so bei Trillium kamschaticum (MATSUURA et al., 1963), Nigella damascena (NATARAJAN u. AHNSTRÖM, 1969), Tradescantia (UTSUMI, 1971), sowie beim Frosch (SHAH, 1975).

Wie bei Vicia faba, so liegen die durch Mitomycin C in Hautfibroblasten (HOEHN u. MARTIN, 1973) und Lymphozyten des Menschen in vitro induzierte Chromosomenaberrationen nicht randomisiert vor. Ihre Verteilung weist sowohl intra- als auch

interchromosomale Unterschiede auf. Lokalisiert wurden Bruchstellen überwiegend in den Chromosomen 1, 9 und 16 (COHEN u. SHAW, 1964; NOWELL, 1964; GERMAN u. La ROCK, 1969; MORAD et al., 1973; BOURGEOIS, 1974; FUNES-CRAVIOTO et al., 1974), und zwar im proximalen Teil des langen Arms, der sekundäre Konstriktionen aufweist, konstitutives Heterochromatin enthält (ARRHIGI u. HSU, 1971) und spät repliziert (SCHMID, 1963).

Eine weitere Auffälligkeit ist die Induktion von Chromatidexchanges durch Mitomycin C unter Involvierung homologer Chromosomen an homologen Chromosomenabschnitten. Diese bei Vicia faba (RAO u. NATARJAN, 1967; RIEGER et al., 1973) und in menschlichen Lymphozytenkulturen gefundenen Aberrationen (GERMAN, 1964; SHAW u. COHEN, 1965; HOEHN u. MARTIN, 1972; COMINGS, 1975) wurden zurückgeführt auf eine enge Paarung dieser Chromosomenabschnitte während der Interphase durch somatisches Crossing-over (GERMAN, 1964), reguläre somatische Paarung oder spezifisch zusammenhaltenden Effekt durch Mitomycin C (KOBAYASHI, 1960). Neuere Arbeiten (BRØGGER u. JOHANSEN, 1972; BRØGGER, 1974; COMINGS, 1975) negieren diese Hypothese und sehen eine Bevorzugung der C- Banden-Exchange im Zusammenhang mit dem Vorkommen von repetitiver DNA in der Zentromerregion.

Beim Menschen induzieren therapeutisch verabreichte Dosen von Mitomycin C Chromosomenaberrationen. Lymphozytenkulturen dreier behandelter Patienten wiesen zwischen 11 und 19% Zellen mit Aberrationen auf (SINKUS, 1972). Quantitativ und qualitativ ähnelten die beim Menschen in vivo induzierten Aberrationen den in vitro Befunden. Die Mehrzahl der beim Säuger in vivo erhobenen Befunde stammen jedoch von Untersuchungen an Nagern, denen bis zu 20 mg Mitomycin C / kg injiziert wurde. Sowohl im Knochenmark des Chinesischen Hamsters (LAVAPPA u. YERGANIAN, 1972) als auch der Maus (MANYAK u. SCHLEIERMACHER, 1973) induziert Mitomycin C strukturelle Chromosomenaberrationen. Neben Gaps, Chromatidenbrüchen, Chromatidenfragmenten wurden terminale Deletionen und Chromatidenexchange gefunden (MANYAK u. SCHLEIERMACHER, 1973).

Die mutagene Wirkung von Mitomycin C auf die Spermatogenese ist weniger klar. Nach Behandlung männlicher Mäuse und Verpaarung mit unbehandelten Weibchen wurden im Dominant-Letal-Test stadienspezifische Sensibilitätsunterschiede ermittelt (EHLING, 1971; EPSTEIN et al., 1972).Im Gegensatz zu Röntgenstrahlen und anderen alkylierenden Agentien stieg die Häufigkeit dominanter Letalmutationen nur nach Einwirkung von Mitomycin C auf prämeiotische Stadien, Spermatozyten und frühe Spermatiden. Keine Mutationen ließen sich in Spätstadien von Spermatiden und in Spermatozoen induzieren. Die Ursachen induzierter dominanter Letalmutationen führten MANYAK und SCHLEIERMACHER (1973) auf Chromosomenaberrationen zurück. Bei einer Aufarbeitung 6-24 Stunden nach Behandlung männlicher Mäuse konnten in Spermatogonien Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden (ADLER, 1973, 1974; SCHLEIERMACHER, 1973; MANYAK u. SCHLEIERMACHER, 1973). Wie im Knochenmark der Maus fanden sich auch in Spermatogonien Deletionen und Chromosomeninterchange. Wurden die Versuchstiere dagegen erst 50-60 Tage nach der Injektion aufgearbeitet, so fanden sich zwar in Spermatozyten behandelter Ratten strukturelle Chromosomenaberrationen (BEMPONG u. TROWER, 1973), nicht jedoch in Spermatozyten der Maus (GILLIAVOD u. LEONARD, 1971; ADLER, 1974). Die Diskrepanz zwischen Vorkommen vieler symmetrischer Exchangefiguren in Spermatogonien der Maus und dem Fehlen von Translokationen in Spermatozyten ist nicht eindeutig zu klären. So wäre möglich, daß Spermatogonien mit Translokationen im weiteren Verlauf der Spermatogenese eliminiert werden, das heißt absterben. Nur nicht mutierte Spermatogonien wären somit in der Lage weitere Teilungen zu durchlaufen und wären später im Spermatozytenstadium analysierbar. Hierfür würde sprechen, daß bei behandelten Tieren das Testesgewicht stark reduziert wird, Mitomycin C also mitosehemmend wirkt (GILLIAVOD u. LEONARD, 1971).

Bei näherer Analyse der in Spermatogonien induzierten Deletionen fällt auf, daß solche vom Chromatidtyp mit Bruchstellen nahe dem Zentromerbereich überwiegen (ADLER, 1974). Da die Maus nur akrozentrische Chromosomen aufweist, besteht die Möglichkeit, daß bei einer Involvierung des gesamten langen Armes in reziproke Exchange nur eine begrenzte Chance besteht, sie als Quadrivalent im Spermatozytenstadium analysieren zu können.

Weitere Analysen erfolgten an Spermatozyten im Diakinese-Metaphase I Stadium von Mäusen, die Mitomycin C während der frühen Prophase der Meiose oder während der der Meiose vorangehenden DNA Synthese injiziert bekommen hatten (ADLER, 1976). Diese Untersuchungen bestätigen die an Vicia faba erstellten Befunde (SHAH et al., 1972), daß Mitomycin C am effektivsten während der DNA Synthese wirkt.

Aufgrund der wenigen und zum Teil widersprüchlichen Befunde an Spermatogonien und Spermatozyten und dem völligen Fehlen von Untersuchungen über die Induktion von Chromosomenaberrationen in Keimzellen weiblicher Säuger, kommt VIG (1977) am Ende eines Reviews über Mitomycin C zu der Feststellung, daß "Gametic cells seem to have some poorly understood mechanism offering them special protection as suggested by the limited data discussed in the review".

5. Material und Methoden

5.1. Chemikalien

a: Testsubstanzen

Mitomycin C	Kyowa Hako Kogyo Co., Tokyo
Trenimon	Bayer AG, Leverkusen

b. Hormone zur Östrusstimulierung

Intergonan = pregnant mare's serum = PMS	Vemie Veterinär Chemie, Kempen
Predalon = human chorionic gonadotropin = HCG	Organon, Oberschleißheim

c. Enzyme

Hyaluronidase = Kinetin (1 Ampulle = 150 IU Hyaluronidase)	Fluka, Berlin
Pronase P aus Streptomyces griseus	Schering, Berlin
Trypsin	Difco, USA

d. Antibiotika

Penicillin G	Hoechst, Frankfurt
Streptomycin	Bastian, München

e. Metaphaseblocker

Colchicin	Serva, Heidelberg
Vincristin	Lilly, Lahn-Giessen

f. Medien

Hanks' balanced salt solution	Flow Laboratories
McCoy's 5A Medium mit Glutamin	Microbiological Associates

g. Färbelösungen

Giemsa	Merck, Darmstadt
Orcein	Merck, Darmstadt

Sämmtliche übrigen Chemikalien stammten von Merck, Darmstadt und hatten den Reinheitsgrad p.a.

5.2. Versuchstiere

Um die mutagene Wirkung von Trenimon zu untersuchen, wurden 8-15 Wochen alte Syrische Hamster (=Goldhamster, Mesocricetus auratus) eingesetzt. Die Hamster wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierkunde Hannover bezogen.

Mutagenitätsuntersuchungen mit Mitomycin C wurden an 8-15 Wochen alten Mäusen des Stammes NMRI durchgeführt. Die Mäuse entstammten der Zentralen Veruchstieranlage der Universität Düsseldorf.

Beide Tierspezies wurden bei 22°C und 50-70% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Der künstliche Licht-Dunkel-Rhytmus wurde per Zeitschaltuhr geregelt. Die Dunkelperiode dauerte von 18°° bis 6°° Uhr.

Die Zahl der in den einzelnen Versuchsserien eingesetzten Tiere ist den Tabellen des Ergebnisteils zu entnehmen.

5.3. Lösung und Applikation der Testsubstanzen

Trenimon wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und Syrischen Hamstern intraperitoneal injiziert. Die Dosen betrugen 0,031 mg/kg, 0,250 mg/kg, 2,0 mg/kg oder 10 x 0,025 mg/kg. Das Volumen der injizierten Lösung betrug 0,5 ml pro Hamster.

Mitomycin C wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Die applizierten Dosen waren 0,625 mg/kg, 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg oder 20 mg/kg. Das Volumen der pro Maus intraperitoneal injizierten Lösung betrug 0,5 ml.

5.4. Methoden

5.4.1. Oozytenmethode beim Syrischen Hamster

Um beim Syrischen Hamster die Ovulation stimulieren, eine Superovulation induzieren und Methaphase II Chromosomen präparieren zu können, wurden die bei der Maus angewendeten Methoden (RÖHRBORN u. HANSMANN, 1971) wie folgt modifiziert (BASLER, 1978, 1979a):

Das Auftreten des postovulatorischen Vaginalschleims wurde benutzt, um den Tag 1 des 4 Tage dauernden natürlichen Östruszyklusses zu bestimmen (EDWARDS u. GATES, 1959). Um 10°° h am

Morgen dieses Tages wurden den Hamsterweibchen 25 IU PMS (pregnant mare's serum) intraperitoneal injiziert. 78 1/2 Stunden später, das heißt am späten Nachmittag des 4. Tages des Östruszyklusses, wurden 20 IU HCG (human chorionic gonadotropin) injiziert.

16 Stunden nach der HCG Applikation wurden die Weibchen getötet, die Eileiter abpräpariert und in ein Blockschälchen übertragen, das 37°C warme Hanks' Lösung enthielt. Die von der Corona radiata umgebenen Oozyten wurden aus der Ampulle freipräpariert und in ein Blockschälchen mit Hyaluronidase (100 IU/ml phys. NaCl-Lösung) übertragen. Nach Auflösung der Corona radiata (ca. 20 min) wurden die Oozyten mittels einer ausgezogenen Pasteurpipette für 2 min in eine Pronaselösung (Pronase P von Streptomyces griseus; 112,5 PUK units/ml phys. NaCl-Lösung) eingebracht. Anschließend erfolgte die hypotone Behandlung für 60 min bei 4°C in einer 1,5%igen Natriumcitratlösung. Danach wurden die Oozyten einzeln auf einen fettfreien, kalten Objektträger übertragen. Die unter präpariermikroskopischer Betrachtung zu vollziehende Fixierung erfolgte durch tropfenweise Zugabe von Methanol-Eisessig-Gemisch (3:1). Nach Lufttrocknung wurden die Präparate eine Stunde in 2%igem Orcein gefärbt.

5.4.2. Oozytenmethode bei der Maus

Die Ovulation bei Mäusen wurde nach der Methode von FOWLER und EDWARDS (1957) mit PMS und HCG stimuliert. Hierzu bekamen die weiblichen Mäuse um 16^{30} h 1,5 IU PMS in 0,5 ml phys. NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert. 48 Stunden später wurde ihnen 2 IU HCG in 0,5 ml phys. NaCl-Lösung appliziert.

16 Stunden nach der HCG Injektion wurden die Mäuse getötet. Die Oozyten wurden aus den Ampullen der Eileiter entnommen und nach der Methode von TARKOWSKY (1966), modifiziert von RÖHRBORN und HANSMANN (1971), präpariert und mit Orcein gefärbt.

5.4.3. Präparation von Chromosomen des Knochenmarks

Zwei Stunden vor Präparationsbeginn wurde den Mäusen 10 mg Colchicin/kg intraperitoneal injiziert. Da der Syrische Hamster eine natürliche Resistenz gegen Colchicin und Colcemid zu haben scheint (ORSINI u. PANSKY, 1952; TURBYFILL u. SODERWALL, 1957;

MIDGLEY et al., 1959), wurde den Hamstern zur Arretierung von Metaphasen 2 mg Vincristin/kg injiziert. Zwei Stunden nach der Applikation des Spindelfasergiftes wurden die Tiere getötet, die Femura freipräpariert und Metaphasen des Knochenmarks nach der Methode von SCHMID und STAIGER (1969) mit folgenden Modifikationen präpariert:

Das Knochenmark wurde mit 30°C warmer Hanks' Lösung (2 ml/Femur) herausgespült. Die Zellsuspension wurde durchpipettiert und anschließend 5 min bei 1200 Upm (Heraeus Christ Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Oberstand wurde verworfen, das Sediment gut aufgeschüttelt. Die hypotone Behandlung erfolgte bei 30°C durch 5 ml einer zupipettierten 1%igen Natriumcitratlösung. Nach 20 min wurde die Suspension 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment gut aufgeschüttelt und 5 ml des Fixativs (Äthanol + Eisessig = 2,5 + 1) zupipettiert. Nach 30 min wurde der Fixiervorgang wiederholt. Nach frühestens 2 Stunden wurde die im Kühlschrank aufbewahrte Suspension erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 0,5 ml frischem Fixativ resuspendiert. Auf fettfreie, kalte, aus aqua dest. entnommene Objektträger wurden ca. 10 Tropfen der Zellsuspension aufgetropft, verblasen und über einem Bunsenbrenner abgeflammt. Hierbei wurde eine Erwärmung des Objektträgers über 60°C vermieden. Nach einer Lufttrocknung wurden die Präparate 10 min in 5%iger Giemsalösung gefärbt.

5.4.4. Zygotenpräparation

Unmittelbar nach Applikation der Testsubstanz wurden Mäuseweibchen mit unbehandelten Männchen im Verhältnis 2 : 1 verpaart. Der Paarungszeitraum betrug maximal 3 Tage.

Um Chromosomen im Zygotenstadium aufarbeiten zu können, wird bei der von RÖHRBORN et al. (1977) beschriebenen Methode befruchteten Weibchen 2 Stunden vor der Sektion Colchicin injiziert. Die Chromosomenpräparation nach der für Oozyten beschriebenen Technik (TARKOWSKI, 1966; RÖHRBORN u. HANSMANN, 1971) erfolgt nach Ausspülung der präimplantativen Embryonen aus den Eileitern.

Diese Methode weist jedoch einige Schwierigkeiten auf. Da der Zeitpunkt der Ovulation, der Befruchtung und somit der statt-

findenden ersten mitotischen Teilung intraindividuell variiert, befindet sich nur eine begrenzte Zahl der Zygoten im analysierbaren Metaphasestadium. Um in etwa den Zeitabschnitt ermitteln zu können, in dem sich die Chromosomen in der Metaphase darstellen, ist es zuvor notwendig, den Zeitpunkt der Befruchtung zu ermitteln. Hierzu müssen Weibchen stündlich nach der Verpaarung auf das Vorhandensein eines Vaginalpfropfs hin überprüft werden (HANSMANN, 1973). Um ca. 20 Stunden nach der Befruchtung Zygoten aufarbeiten zu können, müssen Tiere schon Wochen zuvor in einem Raum mit umgekehrtem Tag/Nacht Rhytmus gehalten werden, oder aber die Aufarbeitung muß nachts erfolgen.

All diese Schwierigkeiten sind bei der von PAYNE und JONES (1975) beschriebenen und hier nach Modifikationen angewendeten Methode zu umgehen. So erfolgt die Sektion trächtiger Tiere am 1. Morgen nach der Verpaarung, wobei als Kriterium für diesen Tag das Auftreten eines Vaginalpfropfes gilt. Von befruchteten Weibchen wurde um 10^{30} h begonnen die Zygoten zu isolieren, um sie anschließend unter Zugabe eines Spindelfasergiftes zu kultivieren. Hierzu wurden die Weibchen durch Genickbruch getötet, die Eileiter freipräpariert und in ein Blockschälchen übertragen, das 37°C warmes Kulturmedium (Tab.1) enthielt. Die Ampulle der Eileiter wurde mit einer spitzen Präpariernadel angerissen, so daß die von der Corona radiata umgebenen Zygoten herausquellen konnten. Durch zweimaliges Wechseln des Mediums wurden die Zygoten gewaschen.

Sterile Petrischalen (ϕ 60 mm) wurden mit 37°C warmem Paraffinöl (Saybold, Viskosität 125-135, Fisher, Inc.) gefüllt. Unter das Öl wurde ein ca. 0,5 ml großer Tropfen des Kulturmediums pipettiert. In diesen Kulturtropfen wurden mittels einer ausgezogenen Pasteurpipette die Zygoten jeweils eines Muttertieres übertragen (BRINSTER, 1969).

Die Kultivierung erfolgte in einem CO_2 Brutschrank (Heraeus KB 600 CO_2) bei 37°C. Der pH von 7,2 wurde aufrechterhalten durch eine Begasung von 5 - 10% CO_2 in Luft. Die 24-stündige Kultivierung erfolgte in einem BIGGERS-WHITTEN-WHITTINGHAM (1971) Medium (Tab.1), dem Colchicin (10^{-6}M), sowie Antibiotika und Phenaolrot als Indikator zugegeben wurden.

Tabelle 1: Medium zur Zygotenkultivierung

	g/l	mM	
NaCl	5,540	94,79	
KCl	0,356	4,78	
Calciumlactat·$5H_2O$	0,527	1,71	
KH_2PO_4	0,162	1,19	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,294	1,19	
$NaHCO_3$	2,106	25,07	
Brenztraubensäure	0,040	0,36	
Natriumlactat	2,416	21,55	= 3,66 ml einer 50%igen
Glucose	1,000	5,56	Natriumlactat Lösung
Albumin aus Rinderserum	1,500		
Streptomycin-Sulfat	0,050		
Penicillin G	0,060		
Phenolrot	0,010		

Das Medium wurde mit pyrogenfreiem aqua bidest. angesetzt und durch einen Millipore Filter (Porengröße 0,45µm) filtriert. Vor Kultivierungsbeginn wurde das Medium auf 37°C erwärmt.

Nach 24-stündiger Kultivierung wurden die Zygoten mittels einer ausgezogenen Pasteurpipette in Hyaluronidase (eine Ampulle Kinetin = 150 IU Hyaluronidase gelöst in 1 ml Ringer) übertragen. Nach Auflösung der Corona radiata erfolgte die hypotone Behandlung und Fixierung der Zygoten nach der für Oozyten (5.4.2.) beschriebenen Methode.

5.4.5. Der Dominant-Letal-Test

Unmittelbar nach Injektion der Testsubstanz wurden Mäuseweibchen mit unbehandelten Männchen verpaart. Die Verpaarungsdauer betrug maximal 3 Tage, wobei ein Männchen mit zwei Weibchen gepaart wurden.

Die Sektion der trächtigen Weibchen erfolgte am 13. oder 16. Tag post coitum. Ausgewertet wurden:

a) Zahl der gepaarten Weibchen
b) Zahl der Weibchen mit Implantaten
c) Zahl der Corpora lutea
d) Zahl der Implantate
e) Zahl der Deziduomata und früh abgestorbenen Implantate
f) Zahl der spät abgestorbenen Implantate
g) Zahl der lebenden Implanate

Zwischen echten Deziduomata und frühem fetalen Tod, wenn bereits ein Amnion und eine dunkelrote Plazenta erkennbar sind, bestehen fließende Übergänge. Eine klare Unterscheidung zwischen beiden Stadien wäre nur anhand histologischer Schnitte möglich. Aus diesem Grund wurden beide Stadien zusammengefaßt und den spät abgestorbenen Implantaten gegenübergestellt.

Die Häufigkeit der dominanten Letalmutationen wurde nach der Formel von EHLING et al. (1968) berechnet:

$$100 - \frac{\text{Lebende Embryonen pro Weibchen (Behandlungsgruppe)}}{\text{Lebende Embryonen pro Weibchen (Kontrolle)}} \times 100$$

5.4.6. Bestimmung des präimplantativen Verlustes

Nach Zählung der Corpora lutea und der Gesamtimplantate wurde aus der Differenz der präimplantative Verlust bestimmt. Um den mit dieser Methode (5.4.5.) ermittelten präimplantativen Verlust zu überprüfen, wurde ein zweites Verfahren angewendet. Unbehandelte Weibchen (Kontrollserie) sowie Weibchen, denen Mitomycin C injiziert worden war, wurden mit unbehandelten Männchen verpaart. Am Morgen nach der Verpaarung wurden die Weibchen auf das Vorhandensein eines Vaginalpfropfs hin überprüft. Weibchen, die die Kopulation vollzogen hatten, wurden getötet. Die Zahl der aus den Ampullen der Eileiter präparierten Oozyten und Zygoten (eine Unterscheidung ist ohne zytologische Aufarbeitung nicht möglich) wurde bestimmt. In einem weiteren Versuch wurden trächtige Weibchen erst am darauffolgenden Tag seziert und die Zahl der aus den Eileitern gespülten Zwei-Zell-Stadien bestimmt.

5.4.7. Präparation von Metaphasechromosomen 13, 16 und 18 Tage alter Embryonen

Die Methode von DATTA et al. (1970) zur Chromosomenpräparation embryonaler Zellen wurde wie folgt modifiziert: Am 13., 16. oder 18. Tag nach der Konzeption wurden die trächtigen Weibchen durch Genickbruch getötet und die Embryonen freipräpariert. 16 und 18 Tage alten Embryonen wurden die Lebern entnommen und in vorgewärmte Blockschälchen übertragen. 13 Tage alte Embryonen wurden als Ganzes weiter aufgearbeitet. 1 ml 37°C warmes Medium (Mc Coy's 5A Medium mit Glutamin) wurde zugegeben. Das embryonale Gewebe wurde zerkleinert (in 3-4 Stücke zerschnitten; anschließend durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Kanüle No. 14). Die Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen übertragen, das 4 ml 37°C warmes Kulturmedium enthielt. Der Suspension wurde Colchicin in einer Konzentration von 10^{-5} M zugegeben.

Die Zellen wurden im Inkubator für 1 - 2 h bei 37°C und einer Begasung mit 5% CO_2 in Luft kultiviert. Nach Abzentrifugation (5 min bei 1500 Upm; Tischzentrifuge) erfolgte für 20 min bei 30°C eine hypotone Behandlung mit 1%iger Natriumcitrat-Lösung. Die Fixierung erfolgte mit Eisessig : Äthanol = 1 + 2,5.

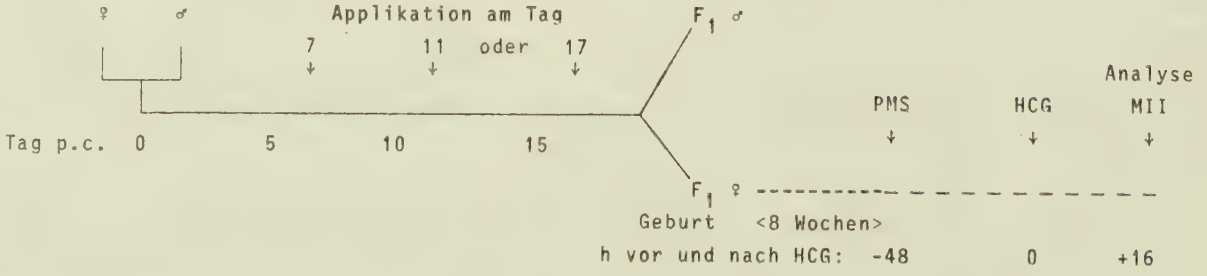
Die Färbung der Chromosomen zur Bandendarstellung erfolgte nach einer 24 bis 48 stündigen Alterung der Präparate bei 60°C. Die Objektträger wurden für 15 sec in 0,05%ige Trypsin-Lösung gegeben. Danach wurden die Präparate zweimal in PBS (8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,15 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ + 0,2 g KH_2PO_4 / 1 l aqua dest.), einmal in 70%igem Äthanol, zweimal in absolutem Äthanol gespült und anschließend luftgetrocknet. Die zehnminütige Färbung erfolgte in 5%iger Giemsa-Lösung (pH 6,8). Die Präparate wurden in Leitungswasser und anschließend zweimal in aqua dest. gespült und nach einer Lufttrocknung mit Eukitt eingedeckt.

5.5. Versuchsaufbau

5.5.1. Diaplazentare Mutagenese

Unbehandelte Mäuseweibchen wurden mit unbehandelten Männchen im Verhältnis 2 : 1 verpaart. Als Kriterium für den 1. Tag post

Abb.7: Versuchsaufbau. Diaplazentare Applikation von Mitomycin C (0,625 mg/kg, 1,25 mg/kg, 2,50 mg/kg oder 5,00 mg/kg) am 7., 11. oder 17. Tag p.c.



coitum (p.c.) galt das Vorhandensein eines Vaginalpfropfes. Trächtigen Weibchen wurde am 7., 11. oder 17. Tag p.c. die Testsubstanz (0,625; 1,25; 2,50 oder 5 mg Mitomycin C /kg) intraperitoneal injiziert. Von den diaplazentar behandelten F_1 Tieren wurden nach der Geburt nur die F_1-Weibchen im Versuch belassen. Zur Synchronisation und zur Stimulierung der Ovulation erhielten diese Weibchen 8 Wochen nach ihrer Geburt PMS und 48 Stunden später HCG appliziert (s. 5.4.2. Oozytenmethode bei der Maus). Getötet wurden sie 16 Stunden nach der HCG Injektion, um Oozyten zur Analyse der Metaphase II Chromosomen zu präparieren (Abb.7).

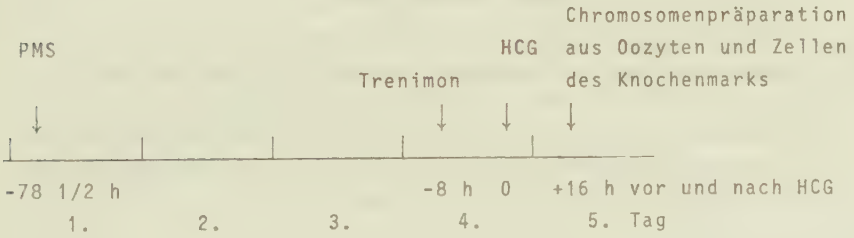
5.5.2. Applikation in der präovulatorischen Phase

Syrische Hamsterweibchen wurden wie unter 4.4.1. beschrieben mit Hormonen vorbehandelt. Die Testsubstanz Trenimon wurde ihnen 8 Stunden vor der HCG-Gabe intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurde 24 Stunden später getötet, das heißt 16 Stunden nach HCG, und Metaphase II Oozyten präpariert (Abb.8a).

Einigen Tieren wurde 2 Stunden vor der Sektion 2 mg Vincristin/kg intraperitoneal injiziert. Nach der Sektion wurden Zellen des Knochenmarks zur zytogenetischen Analyse präpariert (s. 5.4.3.).

Abb.8: Versuchsaufbau - Applikation während der präovulatorischen Phase

a) Untersuchungen am Syrischen Hamster

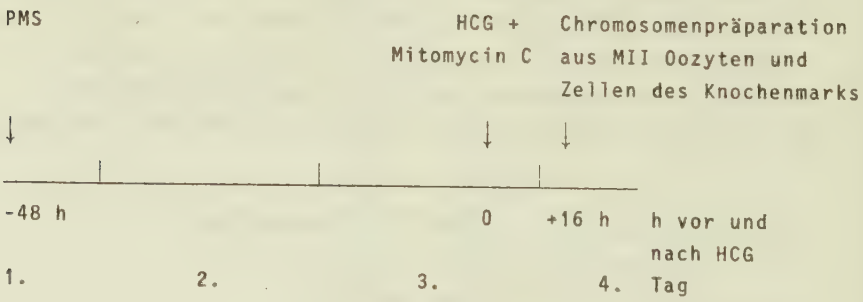


Mäuseweibchen wurden mit den Hormonen PMS und HCG vorbehandelt (s. 5.4.2.). Die Applikation der Testsubstanz Mitomycin C erfolgte zum Zeitpunkt der HCG Injektion. Die Tiere wurden 16 Stunden später getötet und die Oozyten zur Analyse von Metaphase II Chromosomen präpariert (s. 5.4.2.; Abb.8b).

Einige der Tiere erhielten 2 Stunden vor der Sektion 10 mg Colchicin/kg intraperitoneal injiziert. Nach der Sektion wurden die Zellen des Knochenmarks zur zytogenetischen Analyse präpariert (s. 5.4.3.).

Abb.8: Versuchsaufbau - Applikation während der präovulatorischen Phase

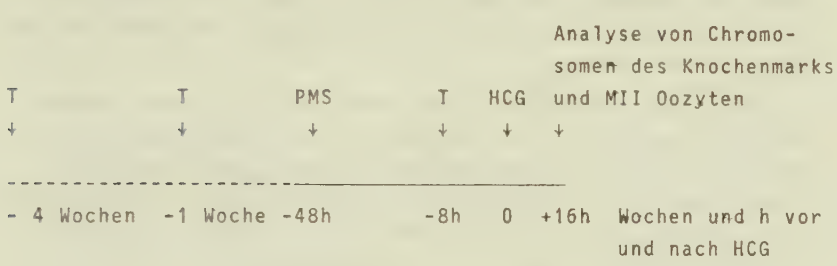
b) Untersuchungen an der Maus



5.5.3. Zeit-Wirkungs-Beziehungen

Wie beschrieben (s.5.4.1.) erhielten die Hamsterweibchen PMS und HCG. Die Testsubstanz Trenimon (0,250 mg/kg) wurde zu verschiedenen Zeiten intraperitoneal injiziert, und zwar 8 Stunden, 1 Woche oder 4 Wochen vor der HCG Injektion (Abb.9). Die Aufarbeitung von Metaphase II Oozyten und Chromosomen des Knochenmarks erfolgte 16 Stunden nach HCG.

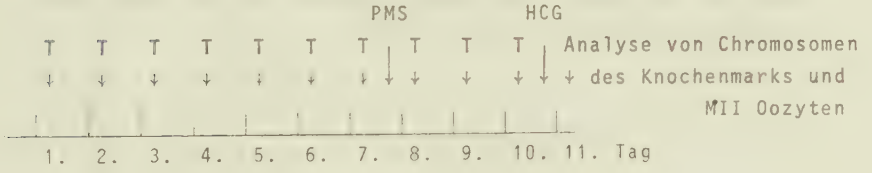
Abb.9: Versuchsaufbau - Zeit-Wirkungs-Beziehungen
Die Applikation von 0,25 mg Trenimon (T)/kg erfolgte 4 Wochen, 1 Woche oder 8 h vor der HCG Injektion



5.5.4. Subchronische Applikation

Syrischen Hamsterweibchen wurde 0,025 mg Trenimon/kg zehnmal im 24 h Abstand injiziert, jeweils um 8^{30} h (Abb.10). Am 7. Applikationstag wurde Hamstern, die in der Nacht zuvor ovuliert hatten, um 10^{30} h PMS injiziert. Diese Weibchen erhielten am 10. Applikationstag um 16^{30} h HCG injiziert. Die Tiere wurden 16 Stunden nach der HCG Injektion seziert und Oozyten und Chromosomen des Knochenmarks präpariert.

Abb.10: Versuchsaufbau - Subchronische Applikation
0,025 mg Trenimon (T)/kg wurde zehnmal im 24 h Abstand injiziert



5.5.5 Die Auswirkungen der in Oozyten induzierten Mutationen auf die Embryogenese

2,5 mg Mitomycin C wurde weiblichen Mäusen um 16^{30} h intraperitoneal injiziert. Unmittelbar danach wurden sie mit unbehandelten Männchen im Verhältnis 2:1 verpaart. Am darauffolgenden Morgen wurde anhand des Vaginalpropfs eine erfolgte Kopulation überprüft.

Einige der verpaarten Tiere wurden am 1. Tag post coitum um 10^{30} h seziert und die Zygoten aus den Ampullen der Eileiter präpariert. Die Zahl der Zygoten pro Weibchen wurde bestimmt (Abb. 11-II). Die Zygoten wurden für 24 h unter Zugabe von Colchicin kultiviert, um anschließend die erste zygotische Metaphase (= Pronukleus- oder Vorkernstadium) zu analysieren (s. 5.4.6., Abb. 11-II).

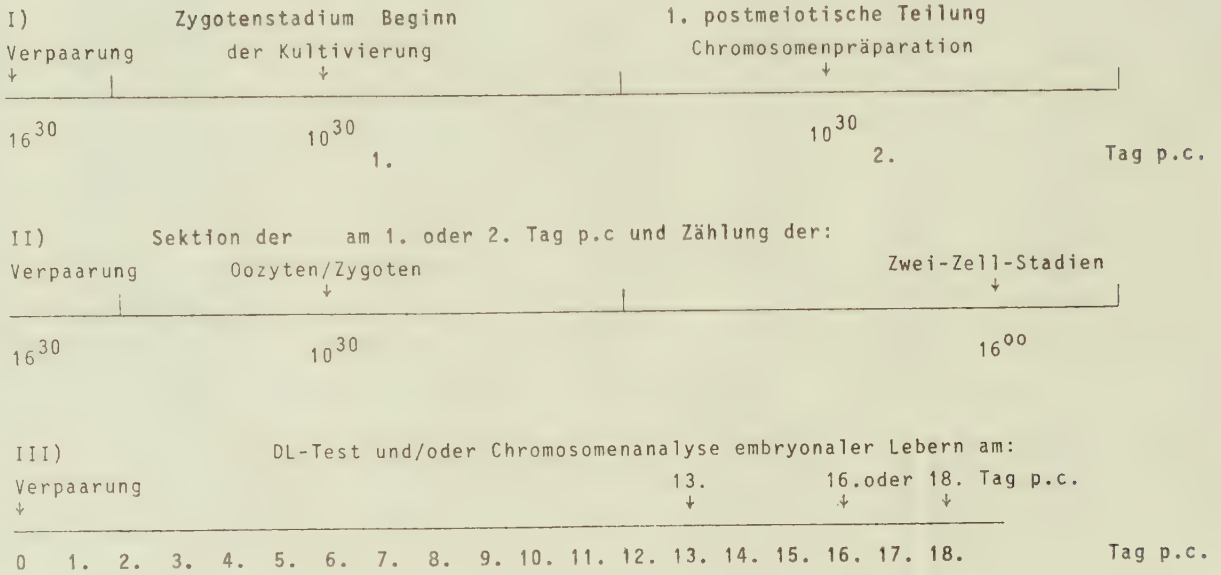
In einer zweiten Serie wurden trächtige Weibchen am 2. Tag p.c. um 16 h seziert. Die Zahl der aus den Eileitern gespülten Zwei-Zell-Stadien pro Weibchen wurde bestimmt (s. 5.4.6., Abb. 11-II).

In einem weiteren Versuch wurden trächtige Weibchen am 13. oder 16. Tag p.c. seziert, der Uterusinhalt analysiert (s. DL-Test 5.4.5.) und die embryonalen Lebern zytologisch aufgearbeitet (s. 5.4.7.; Abb. 11-II).

Desweiteren wurden Leberzellen 18 Tage alter Embryonen präpariert und auf strukturelle Chromosomenaberrationen und Aneuploidien hin untersucht (Abb. 11-III).

Um im Fall von auftretenden Mutationen in embryonalen Zellen sicherzustellen, daß es sich um Neumutationen handelt, wurde auch das Knochenmark der Muttertiere und der zur Verpaarung verwendeten Männchen aufgearbeitet.

Abb.11: Versuchsaufbau Die Auswirkung der in Oozyten induzierten Mutationen auf die Embryogenese



5.6. Auswertungskriterien

Die zytogenetische Auswertung erfolgte in Anlehnung an das "Standardprotokoll zur Auswertung von mitotischen und meiotischen Chromosomen von Mensch und Säugern, ausgearbeitet von der Arbeitsgruppe für Cytogenetik des Bundesministeriums für Forschung und Technologie (unpubliziert)". Danach kamen folgende Kriterien bei der Auswertung von Mitosechromosomen zur Anwendung:

a) Gaps (G)

Gaps sind achromatische Lücken, also nicht anfärbbare Regionen von unterschiedlicher Länge in den Chromosomen. Sie können sowohl vom Chromatiden- als auch von Isochromatidentyp (Isolocusgap) sein.

Nicht gefärbte Abschnitte, die regelmäßig an bestimmten Stellen bestimmter Chromosomen auftraten, beispielsweise die sekundären Konstriktionen, wurden weder als Gaps noch als Isolucusgaps gewertet.

Trotz zahlreicher Hypothesen (BENDER et al., 1974; EVANS, 1963 a,b) ist die Genese dieses Aberrationstyps ungeklärt. Ob ihre Entstehung auf lokale Entspiralisierung der Chromosomen zurückzuführen ist oder auf nicht reparierte Primärläsionen, die Ausgangspunkt für echte Diskontinuitäten der Chromatidstruktur werden können, ist unbekannt. Auch elektronenmikroskopische Untersuchungen (BRØGGER, 1971; SCHEID und TRAUT, 1971 a,b), durch die in den lokalen Achromasien Chromatidenfibrillen nachgewiesen wurden, brachten keine Klärung. Aufgrund der ungewissen genetischen Bedeutung wurde bei der Auflistung unterschieden zwischen Metaphasen mit Aberrationen inklusive und exklusive Gaps.

b) Brüche und Fragmente (B+F)

Eine Aberration wurde dann als Bruch bezeichnet, wenn eine Dislokation des Bruchstückes (inkl. Verschiebung des Chromatids in seiner Längsachse) vorlag und sofern nicht Spiralisationseffekte für die Dislokation in der Längsachse verantwortlich waren. Zu den Brüchen wurden ferner die azentrischen Chromatiden- und Chromosomenfragmente zugeordnet.

c) Chromosomenmutationen

Nach der Bruch-Reunions-Hypothese (STADLER, 1931; SAX,1938,

1940; WOLFF, 1961; EVANS, 1962) sind Bruchereignisse die Voraussetzung für Reunionsfiguren. Unterschieden wurde bei der zytogenetischen Auswertung Giemsa- oder Orcein gefärbter Chromosomen zwischen:

c-1) Deletionen (D)

Bei Deletionen liegt ein interkalarer, bei Defizienzen ein terminaler Stückverlust vor. Das azentrische Fragment ist verlorengegangen oder steht in keinem erkennbaren Zusammenhang mit dem deletierten Chromosom. Da eine Unterscheidung zwischen Deletionen und Defizienzen nur bei gebänderten Chromosomen möglich wäre, wurden beide Aberrationstypen zusammengefaßt als Deletionen.

c-2) Exchanges (E)

Sie sind das Resultat der Vereinigung von Bruchenden zweier oder mehrerer Chromatidbrüche innerhalb eines Chromosoms (=Intrachange) oder in zwei oder mehreren Chromosomen (=Interchange).

d) Multiple Fragmentierungen (Fr)

Hierunter wurden Metaphasen mit fragmentierten und pulverisierten Chromosomen zusammengefaßt.

e) Numerische Aberrationen

Ausgewertet wurden nur Metaphasen mit 2n $\pm$ 2 Chromosomen. Das Auftreten von Aneuploidien oder Polyploidien wurde bei Präparaten des Knochenmarks nicht gewertet, da diese Aberrationen durch das Auftropfen der Zellsuspension präparationsbedingt sein könnten.

Im Gegensatz dazu wurden Oozyten einzeln unter präpariermikroskopischer Betrachtung auf den Objektträger aufgebracht, fixiert und markiert. Hyperploide Chromosomen können somit nicht von benachbarten Metaphasen stammen. Aus diesem Grund wurden in Metaphase II Oozyten außer strukturellen Aberrationen auch numerische Aberrationen gewertet.

Die Metaphasen mit beobachteten strukturellen Aberrationen wurden entsprechend dem Schweregrad induzierter Aberrationen aufgeführt.

Traten in einer Metaphase mehrere strukturelle Aberrationsformen auf, so wurde die Metaphase jedoch nur einmal, und zwar

unter der Aberrationsform der höheren Wertigkeit, aufgeführt. Wies eine Metaphase mehr als 5 Aberrationen auf, so wurde nicht mehr nach Aberrationstypen unterschieden, sondern sie wurde als Zelle mit multiplen Aberrationen (m.A.) eingeordnet. Somit ergab sich folgende Wertung:

Fragmentierungen und Pulverisierungen > multiple Aberrationen > Exchanges > Deletionen > Brüche und Fragmente > Gaps

Umstritten ist hierbei die Wertung der Fragmentierungen und Pulverisierungen. Laut "Standardprotokoll zur Auswertung von mitotischen und meiotischen Chromosomen von Mensch und Säuger" sollen sie gesondert aufgeführt werden. RÖHRBORN und BASLER (1977b) stellten sie in ihrer Wertigkeit unter Gaps, ausgehend von der Oberlegung, daß Keimzellen mit fragmentierten oder pulverisierten Chromosomen keine weiteren Teilungen durchführen, die Mutationen nicht vererben, also ohne biologische Relevanz sind. Andererseits werden Fragmentierungen nur von stärksten Mutagenen und nur nach Applikation hoher Dosen induziert. Ihr Auftreten gibt somit, wie kein anderer Aberrationstyp, Hinweis auf die mutagene Potenz einer Testsubstanz.

5.7. Statistik

Die statistische Absicherung der Befunde im Knochenmark und in embryonalen Leberzellen erfolgte mit Hilfe des Rangtests von MANN und WHITNEY (1947). Wurden mehrere Stichprobengruppen (Dosisgruppen) mit einer Kontrollgruppe verglichen, kam der von NEMENYI (1963) vorgeschlagene Rangtest zur Anwendung. Werte mit $p < 0,02$ wurden als signifikant angesehen.

Um Aussagen über die Anwendung statistischer Methoden zur Absicherung der Befunde im Oozytentest machen zu können, wurden in einer Voruntersuchung sämtliche Einzeltierbefunde aufgelistet, die den in den Jahren 1975-1979 am hiesigen Institut durchgeführten Oozytentests entstammten. Diese Daten wurden von Herrn Dr. Trampisch, Institut für Medizinische Statistik und Biomathematik der Universität Düsseldorf, auf Homogenität hin überprüft. Hierbei zeigte sich:

1) Die Anzahl der pro Tier ovulierten und zur Präparation zur Verfügung stehenden Oozyten betrug 13,39. Die Zahl der zyto-

logisch auswertbaren Oozyten pro Tier schwankt zwischen 1 und 14, wobei die Mehrzahl der Tiere 2 auswertbare Metaphase II Oozyten aufwies.

2) In den zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführten Kontrollserien mit annähernd 1000 Tieren lag die Zahl der Oozyten mit strukturellen Aberrationen bei 1%, der Anteil an Hyperploidien unter 0,5%.

3) Nach Applikation mutagener Chemikalien wiesen einige Tiere mit großer Zahl auswertbarer Metaphasen mehr Mutationen auf, als zu erwarten gewesen wären. Aus diesem Grund ist die Anwendung des χ^2-Tests, wie bisher in der Literatur zu finden, zur Absicherung der Befunde im Oozytentest nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher zwar die Zahl der auswertbaren Oozyten aller Tiere einer Serie summiert, ebenso die Zahl der Oozyten mit Mutationen, sowie Prozentwerte angegeben, zur statistischen Absicherung wurde jedoch die Zahl der Tiere mit Mutationen herangezogen:

Aufgrund der variablen (1-14) und im Mittel geringen (2) Zahl auswertbarer Oozyten pro Tier wurden zur statistischen Absicherung nur Tiere mit einer analysierten Oozyte herangezogen. Falls in einem Tier mehr als eine Metaphase II Oozyte oder Zygote auswertbar war, wurde aus allen analysierten Zellen eine randomisiert ausgewählt. Die Absicherung auf dem 5% Niveau erfolgte dann mit Hilfe des Binomialtests mit Normalapproximation, wobei für die Kontrollen aufgrund der Vorversuche die Wahrscheinlichkeit für Mutationen mit 1% angenommen wurde. Eine signifikante Erhöhung lag somit vor, wenn

$$x_n \geq 1{,}6449 \sqrt{0{,}01 \cdot n \cdot 0{,}99} + n \cdot 0{,}01$$

wobei n der Stichprobenumfang der Versuchstiere ist und x_n die Anzahl der Versuchstiere mit einer Mutation.

Die Häufigkeit der dominanten Letalmutationen wurde nach der Formel von EHLING et al. (1968) berechnet. Die statistische Absicherung der Befunde im Dominant-Letal-Test erfolgte dankenswerterweise durch Herrn Dipl. Math. VOLLMAR nach dem von ihm publizierten Verfahren (1977).

6. Ergebnisse

6.1. Die ovulatorische Phase der Oogenese beim Syrischen Hamster

Weibliche Syrische Hamster wurden mit luteinisierenden Hormonen wie unter 5.4.1. beschrieben vorbehandelt. Um den meiotischen Verlauf der ovulatorischen Phase untersuchen zu können, wurden die 38 Hamster zu verschiedenen Zeiten nach der HCG Injektion getötet. Die Oozyten wurden durch Punktierung der Follikel gewonnen bzw. nach Eintritt der Ovulation aus den Eileitern präpariert.

In der ersten und zweiten Stunde nach der Hormoninjektion befanden sich noch alle Oozyten der sechs untersuchten Hamster in der ersten meiotischen Prophase (Abb.12, 13a). Zwischen der 2. und 3. Stunde nach der HCG Applikation findet der Obergang in das Metaphase I Stadium statt. Bei einem von drei aufgearbeiteten Hamstern lagen die Oozyten bereits im Metaphase I Stadium vor (Abb.12, 13b). Eine Stunde später hatten alle Hamster dieses Stadium erreicht. Das Metaphase I Stadium scheint mit fünf bis sechs Stunden relativ lang zu sein, im Vergleich zu Metaphasestadien mitotisch sich teilender Zellen. Die Oozyten aller fünfzehn in diesem Zeitraum getöteten Tiere befanden sich in diesem Stadium. Neun Stunden nach der HCG Injektion fand ein sichtbarer Wechsel statt. Während die Oozyten eines Weibchens noch Metaphase I Stadien aufwiesen, befanden sich die eines anderen Tieres zum Teil im Metaphase I und zum Teil bereits im Anaphase I Stadium. Nur Anaphase I Stadien wurden bei einem dritten zu diesem Zeitpunkt getöteten Tier gefunden. Die Anaphase I (Abb.13c) scheint somit wie bei der Maus innerhalb weniger Minuten abzulaufen. Die Oozyten von zwei weiteren Hamstern hatten zu diesem Zeitpunkt schon das Metaphase II Stadium erreicht.

Die Ovulation findet 9 1/2 bis 11 Stunden nach der Verabreichung von HCG statt. Von da ab können die Oozyten aus den Eileitern gespült werden. Findet keine Befruchtung statt, so verbleiben die Oozyten, wie bei Mäusen des Stammes NMRI, für mehrere Stunden im Metaphase II Stadium. Bei einer Aufarbeitung 16 Stunden nach der HCG Injektion, das heißt am Morgen nach der Ovulation um 8^{30} h, befinden sich die Oozyten noch immer im Metaphase II Stadium (Abb.12, 13d).

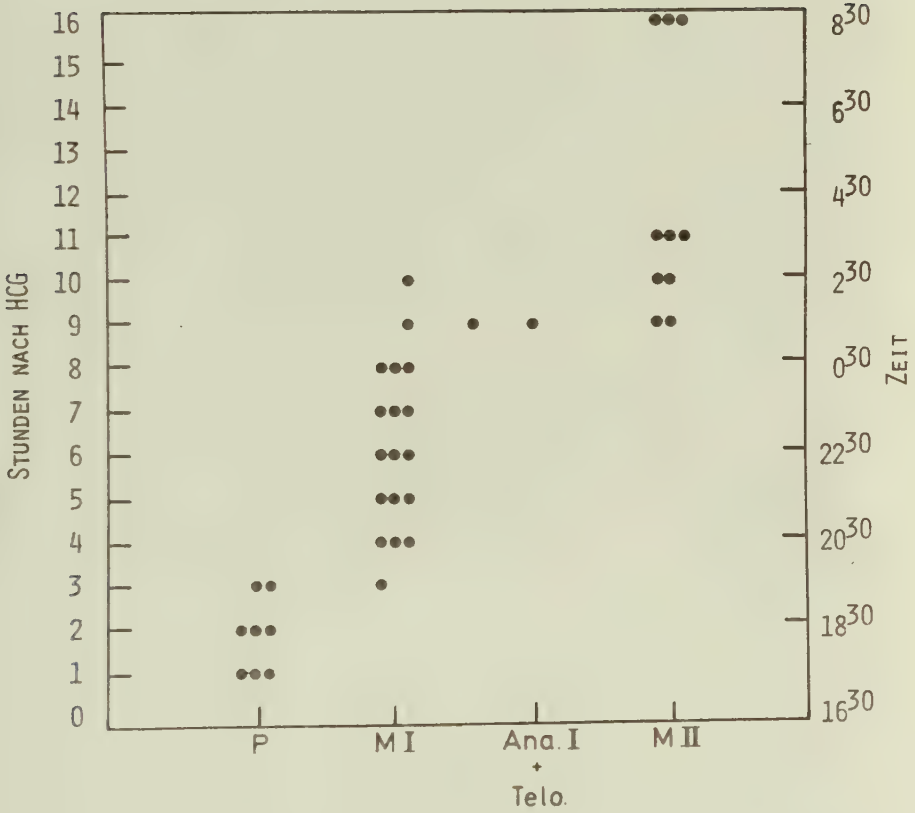
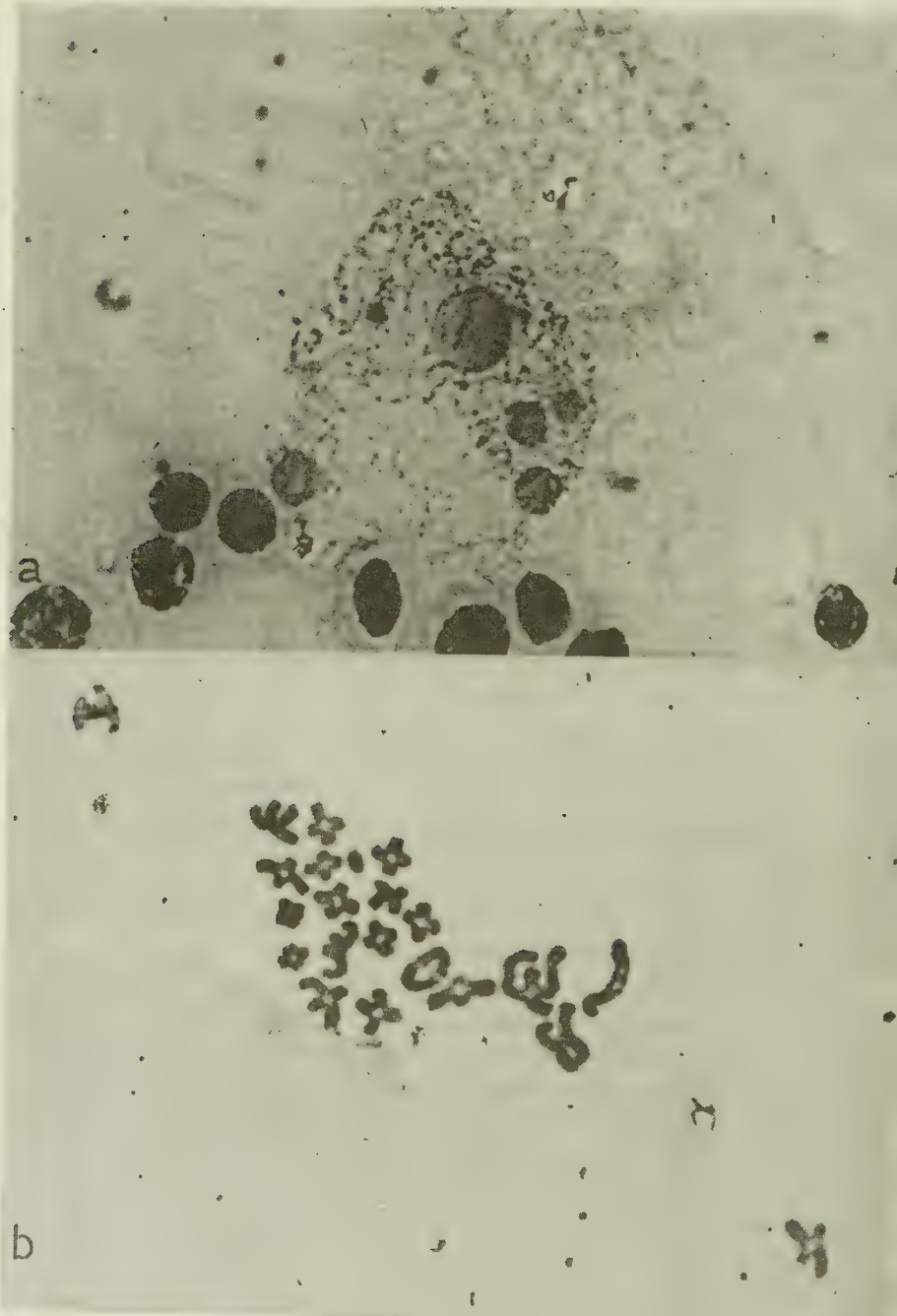
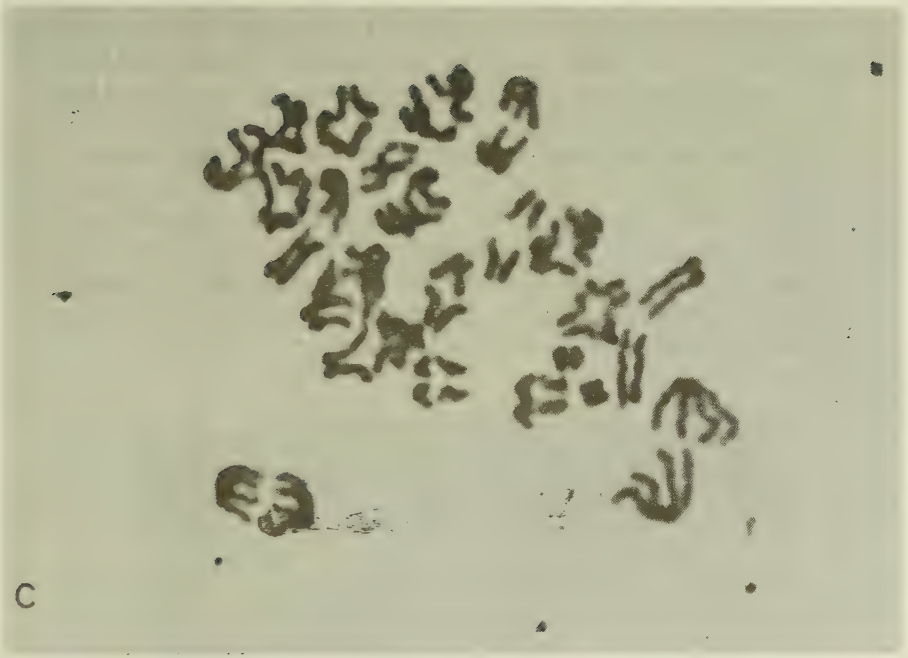
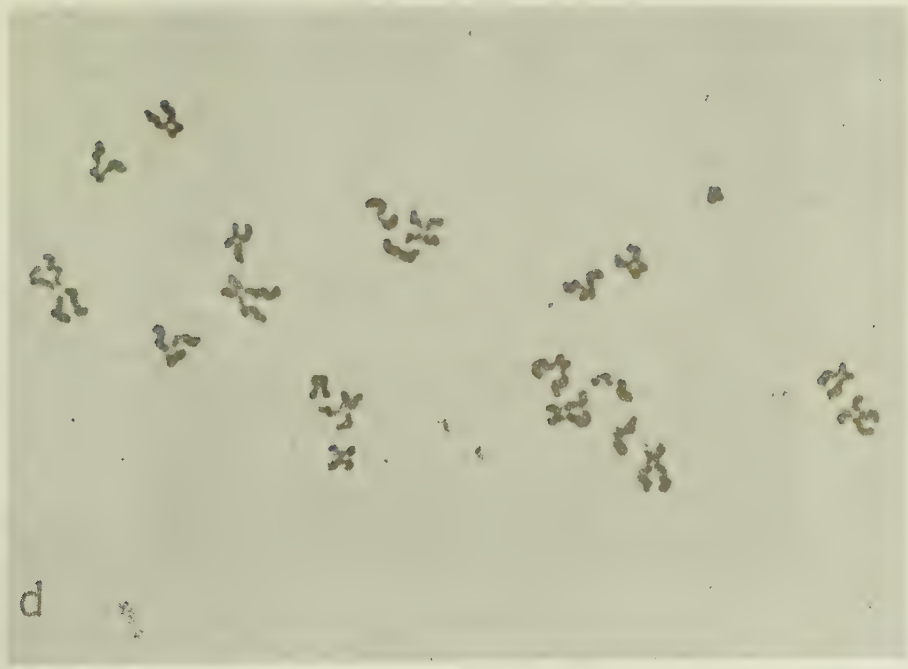


Abb.12: Der Verlauf der meiotischen Stadien in Oozyten des Syrischen Hamsters nach Injektion des ovulationsauslösenden Hormons HCG. P = Prophase, MI = Metaphase I, Ana. I = Anaphase I, Telo. Telophase, MII = Metaphase II
● = 1 Syrischer Hamster

Abb.13: Meiotische Stadien aus Oozyten des Syrischen Hamsters
a) Prophase, b) Metaphase I, c) Anaphase I, d) Metaphase II




c


d

Mit Hilfe der unter 5.4.1. beschriebenen Methode (Oozytenmethode beim Syrischen Hamster) ist es möglich, eine große Zahl gut auswertbarer Metaphasen (8,7 Metaphasen pro Weibchen der Kontrollgruppe; Tab.2) zu erhalten. Dabei stellt sich, wie für Metaphasen des Knochenmarks beschrieben (LEHMAN et al., 1963), folgender Karyotyp dar (Abb.14): fünf median metazentrische Chromosomen (Nr.5, 10, 14, 20 und das X-Chromosom), neun submetazentrische Chromosomen (Nr.1, 2, 3, 4, 8, 9, 12, 13 und 15), drei subtelozentrische Chromosomen (Nr.6, 7 und 11), vier große akrozentrische Chromosomen (Nr.16-19) und ein kleines akrozentrisches Chromosom (Nr.21).

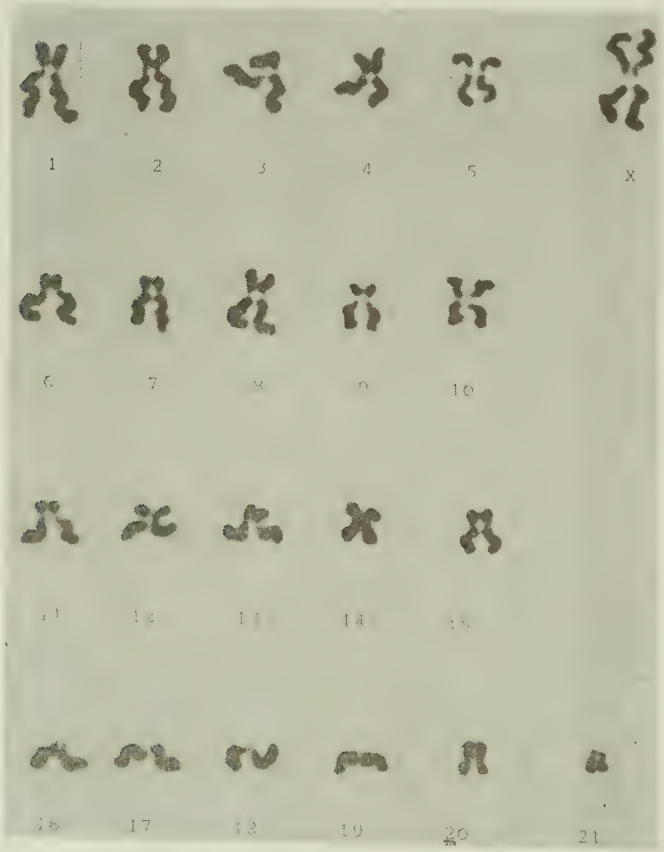


Abb.14: Karyotyp aus einer unbefruchteten Oozyte des Syrischen Hamsters

6.2. Die mutagene Wirkung von Trenimon beim Syrischen Hamster

6.2.1. Applikation in der präovulatorischen Phase

Nach Applikation von Trenimon in der präovulatorischen Phase, daß heißt 8 Stunden vor der HCG Injektion, fanden sich sowohl bei der Maus (RÖHRBORN u. HANSMANN, 1971), als auch beim Chinesischen Hamster (HANSMANN et al., 1974) am häufigsten Aberrationen. Um die Anwendbarkeit des Oozytentests auch beim Syrischen Hamster aufzuzeigen und einen Speziesvergleich anstellen zu können, wurden gleiche Applikationszeiten (8 Stunden vor HCG) und Dosen (0,0031 mg/kg, 0,250 mg/kg, 2,000 mg/kg) wie in den von RÖHRBORN und HANSMANN (1971) durchgeführten Versuchen mit Mäusen gewählt. Auch beim Syrischen Hamster wirkten die verabreichten Trenimon-Dosen nicht toxisch.Keins der Versuchstiere verstarb während der 16-stündigen Einwirkungszeit.

6.2.1.1. Analyse von Metaphase II Oozyten

Die spontane Häufigkeit von Chromosomenaberrationen in Oozyten des Syrischen Hamsters ist extrem gering. In 148 Metaphase II Oozyten fand sich nur ein einziger Chromatidbruch. Sowohl Deletionen, als auch Exchangefiguren oder hyperploide Chromosomen wurden nie beobachtet.

Die Sensibilität und Validität dieser Methode konnte in den Versuchsserien (Tab. 2) gezeigt werden. Die Häufigkeit von Oozyten mit Chromosomenaberrationen stieg von 0,7% in der Kontrolle über 2,9% (0.031 mg/kg), 45% (0,250 mg/kg) auf 100% (2,000 mg/kg) an.

Induziert wurden ausschließlich Chromsomenaberrationen vom Chromatidtyp. Brüche und Fragmente überwogen, jedoch traten auch Gaps und Deletionen auf. In zwei Oozyten fanden sich Interchange (Abb.15). Die Applikation der höchsten Dosis schließlich führte zu einer vollständigen Fragmentierung der Chromsomen (Abb.16).

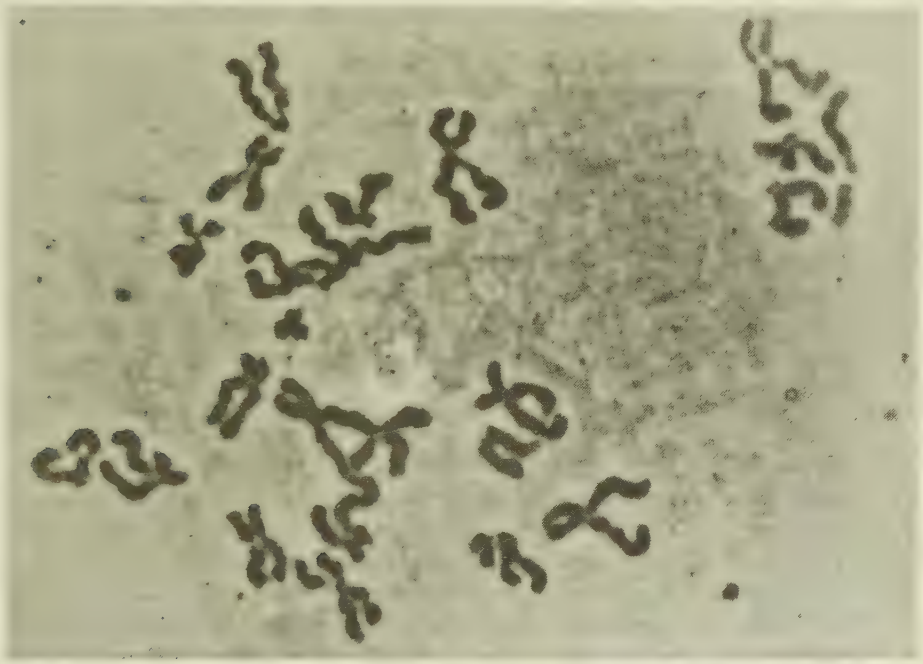
Während die Häufigkeit an Metaphasen mit strukturellen Aberrationen in dosisabhängiger Weise bis zu 100% anstieg, wurden Hyperploidien (>22 Chromosomen) nie beobachtet.

Tab.2: Chromosomenaberrationen in Oozyten des Syrischen Hamsters
Trenimon; i.p.; Applikation 8 h vor HCG

Serie	n Tiere	Ovulation bei n Tieren	n MII analysiert	hyperploide MII	MII mit strukturellen Aberrationen n	%	n Metaphasen II mit: G	B+F	D	E	Fr
Kontrolle	37	35	200	0	1	0,5	0	1	0	0	0
0,031 mg/kg	11	11	100	0	3	3,0	0	2	1	0	0
0,250 mg/kg	13	13	100	0	45	45,0*	3	31	8	3	0
2,000 mg/kg	11	11	100	0	100	100,0*	0	0	0	0	100

*$p < 0,05$

Abb.15: Metaphase II mit strukturellen Chromosomenaberrationen



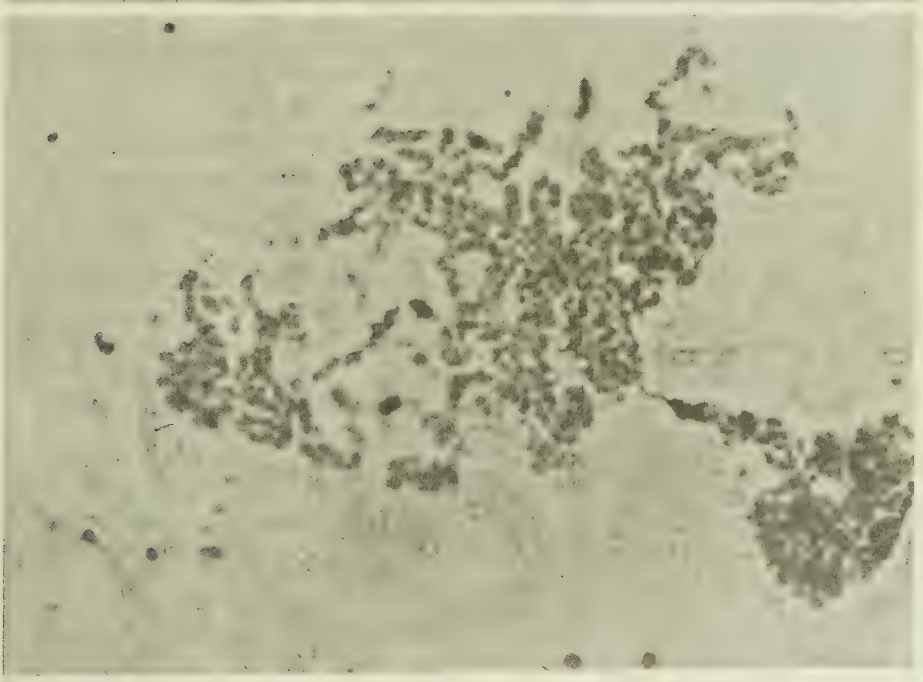


Abb.16: Metaphase II mit fragmentierten Chromosomen

6.2.1.2. Analyse von Metaphasen aus dem Knochenmark

Von einigen Tieren (8 pro Serie) wurden sowohl Oozyten als auch Chromosomen des Knochenmarks präpariert und analysiert, um die Sensibilität der Oozytenmethode mit der Knochenmarksmethode vergleichen zu können.

Auch im Knochenmark des Syrischen Hamsters waren selten spontan auftretende strukturelle Chromosomenaberrationen zu finden. Sowohl inklusive, als auch exklusive Gaps betrug der Prozentsatz an Metaphasen mit Aberrationen 0,38 (Tab. 3). Exchangefiguren, Metaphasen mit multiplen Aberrationen, fragmentierten oder pulverisierten Chromosomen waren hierunter nicht zu finden.

Alle applizierten Trenimon-Dosen induzierten strukturelle Chromosomenaberrationen. Die Erhöhung im Vergleich zu unbehandelten Tieren war in allen Versuchsserien statistisch signifikant ($p < 0,02$). Die niedrigste eingesetzte Dosis, die sich auch als effektiv erwies, war 0,031 mg Trenimon pro kg. Der Prozentsatz an Metaphasen mit Aberrationen (ohne Wertung der Gaps) war auf 2,25 erhöht. Unter 800 analysierten Metaphasen fand sich erstmals ein Exchange.

Nach Injektion der mittleren Dosis von 0,250 mg/kg wurden bereits 31 Metaphasen mit Exchanges analysiert (Abb. 17). 260 Zellen wiesen sogar multiple Aberrationen auf, was weder in der Kontrollserie, noch nach Applikation von 0,031 mg/kg gefunden wurde. 40,13% aller Zellen wiesen Aberrationen auf, unter Negierung der Gaps. Inklusive Gaps erhöhte sich die Häufigkeit auf 41,75%.

Die hohe Dosis von 2,0 mg/kg Trenimon wirkte sich extrem klastogen aus. In 749 der 800 analysierten Zellen lagen die Chromosomen fragmentiert vor. 50 Zellen wiesen multiple Aberrationen auf. Nur eine Aberration, und zwar ein Interchange, wurde in einer Zelle gefunden. Metaphasen ohne strukturelle Aberrationen wurden nicht beobachtet.

Tab.3: Chromosomenaberrationen im Knochenmark des Syrischen Hamsters
Trenimon; i.p.; Applikation 8 h vor HCG

Serie	n Tiere	n Metaphasen analysiert	Metaphasen mit Aberrationen mit Gaps n	%	ohne Gaps n	%	n Metaphasen mit: G	B+F	D	E	m.A.	Fr
Kontrolle	8	800	3	0,38	3	0,38	0	2	1	0	0	0
0,031 mg/kg	8	800	22	2,75	18	2,25	4	15	2	1	0	0
0,250 mg/kg	8	800	334	41,75*	321	40,13*	13	29	1	31	260	0
2,000 mg/kg	8	800	800	100,00*	800	100,00*	0	0	0	1	50	749

* $p < 0,02$

6.2.2. Subchronische Applikation

In den bisherigen Versuchen wurde Trenimon einmal, und zwar in der präovulatorischen Phase injiziert. In weiteren Experimenten sollte nun geklärt werden, ob die Verabreichung niedriger, subchronischer Dosen zu einer Summation mutagener Effekte führt.

6.2.2.1. Analyse von Metaphase II Oozyten

Die Daten der Kontrolle wurden aus der Versuchsserie 6.2.1.1. übernommen, in der in 200 Metaphasen II eine solitäre Aberration auftrat, und zwar ein Chromatidbruch. Die Häufigkeit spontaner Chromosomenaberrationen betrug somit in der Kontrollserie 0,5%.

Die im 24 Stunden Abstand injizierte zehnmalige Dosis von 0,025 mg Trenimon/kg führte zu einer Erhöhung auf 15,6%. Auch in dieser Serie wurden Aberrationen vom Chromatidtyp gefunden, und zwar Brüche und Fragmente (Tab.4).

Mit 15,6% war die Häufigkeit induzierter Aberrationen durch subchronische Trenimon-Injektionen deutlich gegenüber unbehandelten Tieren erhöht. Im Vergleich zur einmaligen Injektion während der präovulatorischen Phase, mit allerdings der zehnfach höheren Einzeldosis von 0,250 mg/kg (Tab.2), ist dieser Wert als gering zu betrachten.

6.2.2.2. Analyse von Metaphasen aus dem Knochenmark

Vergleichbare Befunde wie in Oozyten fanden sich im Knochenmark, das von den gleichen Tieren aufgearbeitet worden war. Die einmalige Injektion von 0,250 mg Trenimon/kg erhöhte das Vorkommen struktureller Chromosomenaberrationen von 0,38% (ohne Gaps) bei unbehandelten Tieren auf 40,13% (Tab.3). Nach zehnmaliger Injektion von 0,025 mg/kg fanden sich unter 800 analysierten Metaphasen 8 Gaps, 5 Brüche und Fragmente und sogar 2 Interchange (Tab.5). Die Häufigkeit der Metaphasen mit Aberrationen lag somit bei 0,88% (mit Gaps 1,88%). Die Werte liegen zwar über den Daten der Kontrolle, jedoch wiederum weit unter denen, die nach einmaliger Applikation von 0,25 mg/kg ermittelt wurden.

Tab.4: Chromosomenaberrationen in Oozyten des Syrischen Hamsters
Trenimon; i.p.; subchronisch; 10 x 0,025 mg/kg im 24 h Intervall
Aufarbeitung 24 h nach der 10. Applikation

Serie	n Tiere	n Metaphasen analysiert	MII mit strukturellen Aberrationen n	%	n Metaphasen II mit: G	B+F	D	E	Fr
Kontrolle	37	200	1	0,5	0	1	0	0	0
10 x 0,025 mg/kg	30	100	16	16,0*	0	16	0	0	0

*p < 0,05

Tab.5: Chromosomenaberrationen im Knochenmark des Syrischen Hamsters
Trenimon; i.p.; subchronisch; 10 x 0,025 mg/kg im 24 h Intervall
Aufarbeitung 24 h nach der 10. Applikation

Serie	n Tiere	n Metaphasen analysiert	Metaphasen mit Aberrationen mit Gaps n	%	ohne Gaps n	%	n Metaphasen mit: G	B+F	D	E
Kontrolle	8	800	3	0,38	3	0,38	0	2	1	0
10 x 0,025 mg/kg	8	800	15	1,88*	7	0,88	8	5	0	2

*p < 0,02

6.2.3. Zeit-Wirkungs-Beziehungen

Die Ursache dafür, daß es im Knochenmark zu keiner Summation mutagener Effekte kommt, könnte darin zu suchen sein, daß die zuerst induzierten Chromosomenaberrationen während der zehntägigen Injektion bereits eliminiert worden sind. Zur Klärung dieser Frage sollen in weiteren Versuchen die Häufigkeit nachweisbarer Chromosomenaberrationen in Zellen des Knochenmarks und in Oozyten in Abhängigkeit vom Aufarbeitungszeitpunkt untersucht werden.

6.2.3.1. Analyse von Metaphase II Oozyten

In den vorangegangenen Versuchen induzierte die mittlere Dosis von 0,250 mg Trenimon/kg zwar Chromosomenaberrationen, jedoch waren die Effekte nicht so stark, daß mit einer Degenerierung sämtlicher Oozyten gerechnet werden mußte. Aus diesem Grund wurde diese Dosis für weitere Versuche zur Ermittlung von Zeit-Wirkungs-Beziehungen eingesetzt. Hierbei wurde Trenimon zu den Zeiten 8 Stunden, eine Woche, oder vier Wochen vor der HCG Gabe injiziert. Die Aufarbeitung von Oozyten zur Analyse von Chromosomen im Metaphase II Stadium erfolgte wie zuvor 8 Stunden nach der HCG Injektion.

Unter den 150 Metaphasen von 17 unbehandelten Kontrolltieren fand sich nur ein Bruch. Die Häufigkeit spontaner Aberrationen betrug somit 0,7% (Tab.6).

Trenimon, in der präovulatorischen Phase injiziert, das heißt 8 Stunden vor HCG, induziert in hohem Maße strukturelle Aberrationen. Gaps, überwiegend Brüche und Fragmente, daneben aber auch Deletionen und Exchanges wurden analysiert. Der Prozentsatz an Metaphasen II mit strukturellen Aberrationen betrug 45,0%.

In weiteren Versuchen wurde Trenimon 7 Tage vor der ovulationsauslösenden HCG Gabe injiziert. Der Prozentsatz an Oozyten mit strukturellen Aberrationen lag zwar mit 9,0% deutlich über der Spontanrate, jedoch erheblich niedriger als bei einer Aufarbeitung 24 Stunden nach der Trenimon Injektion. Auffällig war desweiteren das Absinken analysierbarer Oozyten. Während es in der Versuchsserie, in der Trenimon 8 Stunden vor

Tab.6: Chromosomenaberrationen in Oozyten des Syrischen Hamsters
Zeit-Wirkungs-Beziehungen
Trenimon; 0,250 mg/kg; i.p.; Applikation zu verschiedenen Zeiten vor HCG

Serie	n Tiere	n MII analysiert	MII mit strukturellen Aberrationen n	%	n Metaphasen II mit: G	B+F	D	E	Fr
Kontrolle	17	150	1	0,7	0	1	0	0	0
8 h vor HCG	13	100	45	45,0*	3	31	8	3	0
1 Woche vor HCG	55	100	9	9,0*	1	6	0	0	2
4 Wochen vor HCG	57	100	6	6,0*	0	5	1	0	0

* $p < 0,05$

HCG verabreicht wurde, noch 7,5 Metaphasen pro Weibchen waren, sank die Zahl hier auf 1,75.

Wurden die Oozyten erst vier Wochen nach der Injektion des Mutagens aufgearbeitet, lag die Häufigkeit struktureller Aberrationen mit 6,0% immer noch über dem Wert der Kontrollserie.

6.2.3.2. Analyse von Metaphasen aus dem Knochenmark

Zur besseren Vergleichbarkeit der Oozytenmethode mit der Analyse von Chromosomen aus dem Knochenmark des Syrischen Hamsters, um intraindividuelle Unterschiede ausschließen zu können, wurde auch in diesem Versuch von ein und demselben Tier (d.h. bei 8 Tieren pro Serie) Oozyten und Chromosomen des Knochenmarks präpariert.

Wie bereits im Versuch 5.2.1.2. (Tab.3) dargelegt, beträgt die Häufigkeit spontan auftretender Chromosomenaberrationen im Knochenmark des Syrischen Hamsters nur 0,38%. Die Injektion von 0,250 mg Trenimon/kg 8 Stunden vor der HCG Applikation erhöht diesen Wert auf 40,13% (exklusive Gaps). Festzuhalten war aus den vorangegangenen Versuchen weiterhin, daß die überwiegende Zahl der Zellen mit Mutationen Exchanges und multiple Aberrationen aufwies.

Wurde das Knochenmark hingegen erst eine Woche nach Injektion des Mutagens aufgearbeitet, sank die Zahl der geschädigten Metaphasen drastisch auf 11 von 800 ab (1,38% exklusive Gaps; Tab.7). Unter den noch auftretenden Aberrationen überwogen Brüche und Fragmente. Exchangefiguren und Zellen mit multiplen Aberrationen fanden sich nicht mehr.

Bereits im Kontrollbereich ($p > 0,02$) liegen die Werte bei einer Aufarbeitung 4 Wochen nach der Trenimon Injektion. Unter Nichtberücksichtigung von Gaps fanden sich Aberrationen nur noch in 0,87% aller Metaphasen.

Tab.7: Zeit-Wirkungs-Beziehungen
Chromosomenaberrationen im Knochenmark des Syrischen Hamsters
Trenimon; 0,250 mg/kg; i.p.; Applikation zu verschiedenen Zeiten vor HCG

Serie	n Tiere	n Metaphasen analysiert	Metaphasen mit Aberrationen mit Gaps n	%	ohne Gaps n	%	n Metaphasen mit: G	B+F	D	E	m.A.
Kontrolle	8	800	3	0,38	3	0,38	0	2	1	0	0
8 h vor HCG	8	800	334	41,75*	321	40,13*	13	29	1	31	260
1 Woche vor HCG	8	800	12	1,50	11	1,38	1	10	1	0	0
4 Wochen vor HCG	8	800	12	1,50	7	0,87	5	4	1	0	2

* $p < 0,02$

Abb.17: Metaphase aus dem Knochenmark des Syrischen Hamsters mit einem Chromosomenexchange

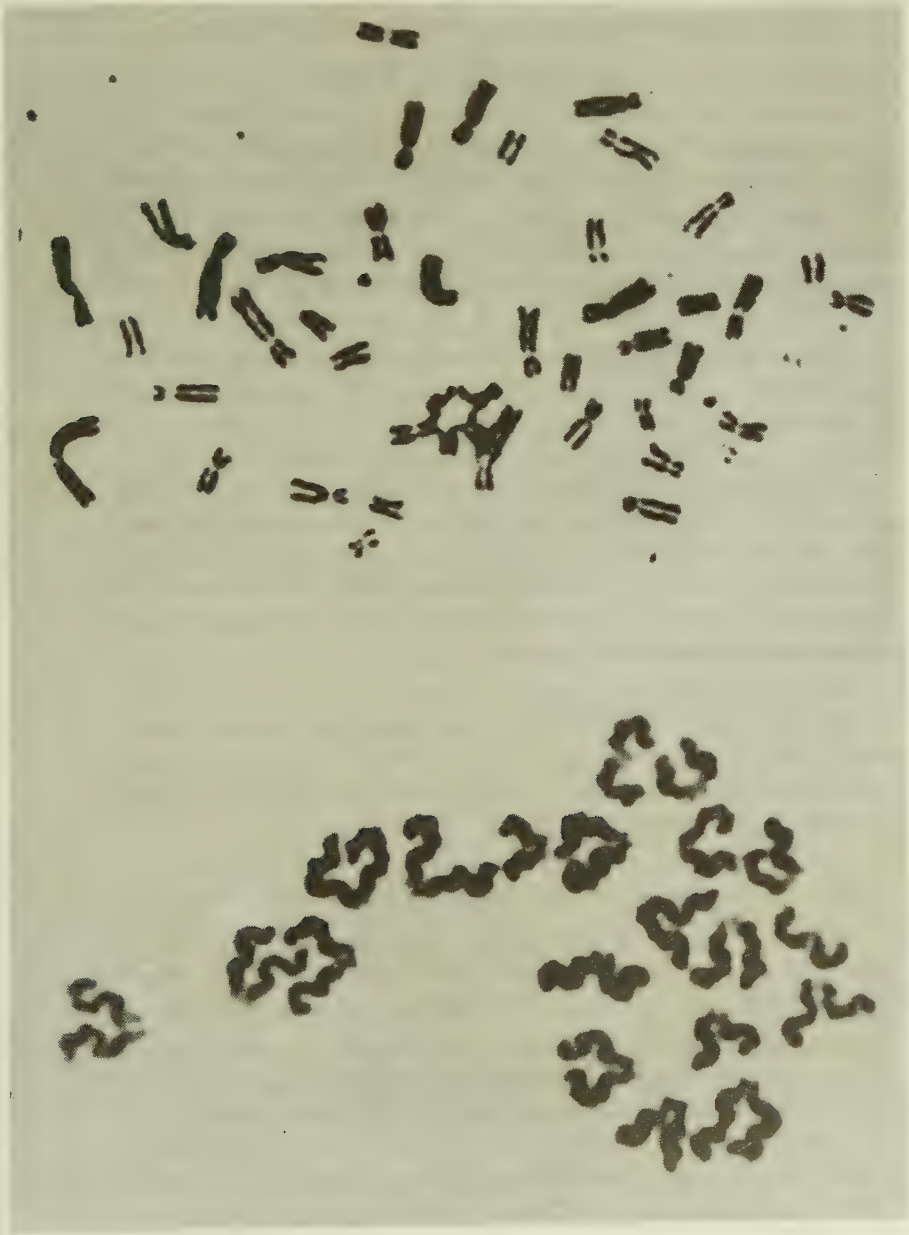


Abb.18: Metaphase II aus einer Oozyte der Maus mit einem normalen haploiden Chromosomensatz

6.3. Die mutagene Wirkung von Mitomycin C bei der Maus

6.3.1. Applikation in der präovulatorischen Phase

6.3.1.1. Analyse von Metaphase II Oozyten

Mit Hilfe der zytogenetischen Analyse von Metaphase II Chromosomen aus Oozyten von Mäusen des Stammes NMRI werden sowohl strukturelle als auch numerische Aberrationen erfaßt.

In 362 analysierten Oozyten von insgesamt 100 Kontrolltieren fanden sich keine spontan auftretenden Aberrationen, weder strukturelle Aberrationen noch Hyperploidien (Tab.8, Abb. 18).

Das in der präovulatorischen Phase (zusammen mit HCG) injizierte Mitomycin C induziert in einer dosisabhängigen Weise Aberrationen. Die Häufigkeit induzierter Aberrationen stieg von 2,5% nach Injektion von 5 mg Mitomycin C/kg über 4,6% (10 mg/kg) auf 6,1% (20 mg/kg). Die induzierten Aberrationen waren fast ausschließlich Aberrationen vom Chromatidtyp und zwar überwiegend Brüche und Fragmente, daneben Gaps und Deletionen. Auffällig oft (in 9 Fällen gegenüber 8 mit sonstigen Deletionen) handelte es sich um den Verlust des gesamten langen Armes einer Chromatide.

Wie in der Kontrollgruppe, so wurden nach Injektion von 5 mg/kg und 10 mg Mitomycin C/kg keine Hyperploidien gefunden. Nur in der höchsten Dosisgruppe waren zwei der 441 analysierten Metaphasen II hyperploid, das heißt sie wiesen 21 anstatt regulär 20 Chromosomen auf.

6.3.1.2. Analyse von Metaphasen aus dem Knochenmark

Wie in den zuvor beschriebenen Versuchen mit Syrischen Hamstern wurden auch von einigen Mäusen (8 pro Serie) sowohl Oozyten präpariert als auch Chromosomen des Knochenmarks.

Auch in Zellen dieses somatischen Gewebes der Maus traten strukturelle Chromosomenaberrationen spontan äußerst selten auf. In 800 Metaphasen, präpariert aus 8 Tieren, wurde nur ein Bruch entdeckt. Deletionen, Exchanges, Zellen mit multiplen Aberrationen oder fragmentierten Chromosomen wurden nicht beobachtet. Die Häufigkeit an Metaphasen mit struktu-

Tab.8: Chromosomenaberrationen in Oozyten der Maus
Mitomycin C; i.p.; Applikation zusammen mit HCG

Serie	n Tiere	n MII analysiert	MII mit Aberrationen n	%	n Metaphasen mit: G	B+F	D	E	Hyperploidie 21 Chromosomen
Kontrolle	100	362	0	0	0	0	0	0	0
5 mg/kg	50	243	6	2,5	0	4	1	1	0
10 mg/kg	50	322	15	4,6*	0	5	10	0	0
20 mg/kg	50	441	27	6,1*	2	17	6	0	2

*$p < 0,05$

rellen Aberrationen betrug somit sowohl inklusive als auch exklusive Gaps nur 0,1% (Tab.9).

In allen Versuchsgruppen der mit Mitomycin C behandelten Mäuse traten strukturelle Chromosomenaberrationen statistisch signifikant häufiger auf als in der Kontrollgruppe. Die geringen Dosen von 1,25 und 2,5 mg/kg, die im Oozytentest nicht eingesetzt wurden, führten bereits zu einer Erhöhung von 0,1% in der Kontrolle auf 2,0% beziehungsweise 10,55% (exklusive Gaps; Tab.9). In überwiegender Zahl traten in beiden Versuchsgruppen Brüche und Fragmente auf. Metaphasen mit fragmentierten Chromosomen wurden nicht beobachtet.

Die Dosis von 5 mg Mitomycin C/kg, die 2,5% aller Oozyten schädigte, wirkte sich im Knochenmark stark mutagen aus. Unter Ausklammerung von Gaps fanden sich in 45,5% aller Metaphasen strukturelle Aberrationen. Hiervon wies die überwiegende Zahl sogar multiple Aberrationen (mehr als 5 Aberrationen pro Zelle) auf. Darüberhinaus waren in 5,1% aller Zellen die Chromosomen fragmentiert (Abb.19b).

Die Dosis von 10 mg Mitomycin C/kg führte sowohl zu einer weiteren Steigerung mutierter Zellen, und zwar auf 87,3%, als auch zu einer Verschiebung des Schweregrades der induzierten Aberrationen. In 318 von 800 analysierten Zellen waren die Chromosomen fragmentiert; 274 wiesen multiple Aberrationen auf. Brüche und Fragmente als schwerste Aberrationen waren in nur noch 25 Metaphasen analysierbar.

Da 10 mg Mitomycin C/kg sich bereits als stark zytotoxisch erwies und darüberhinaus die überwiegende Zahl der Zellen bereits multiple Aberrationen oder fragmentierte Chromosomen aufwies, wurde darauf verzichtet, die im Oozytentest als höchste Dosis injizierte Menge von 20 mg/kg auch im Knochenmarktest einzusetzen.

Tab.9: Chromosomenaberrationen im Knochenmark der Maus
Mitomycin C; i.p.; Aufarbeitung 16 h nach der Applikation

Serie	n Tiere	n Metaphasen analysiert	Metaphasen mit Aberrationen mit Gaps n	%	ohne Gaps n	%	n Metaphasen mit: G	B+F	D	E	m.A.	Fr
Kontrolle	8	800	1	0,1	1	0,1	0	1	0	0	0	0
1,25 mg/kg	8	800	28	3,5*	16	2,0	12	16	0	0	0	0
2,50 mg/kg	8	800	91	11,4*	84	10,5*	7	53	6	13	12	0
5,00 mg/kg	8	800	367	45,9*	356	44,5*	11	103	15	40	157	41
10,00 mg/kg	8	800	702	87,8*	698	87,3*	4	25	2	11	274	318

*$p < 0,02$

Abb.19: Metaphasen aus dem Knochenmark der Maus
a) Metaphase mit einem Chromatidenexchange (s. auch Abb.26)
b) beginnende Fragmentierung

6.3.2. Diaplazentare Mutagenese

In weiteren Experimenten sollte die Sensibilität pränataler Stadien der Oogenese gegenüber dem chemischen Mutagen Mitomycin C ermittelt werden. Hierzu wurden trächtige Mäuse am 7., 11. oder 17. Tag post conceptionem (p.c.) mit dem Mutagen behandelt, so daß das Agens diaplazentar auf frühe primordiale Keimzellen, sich mitotisch teilende Keimzellen oder Oozyten im Pachytänstadium einwirken konnte. Analysiert wurde die mutagene Wirkung an unbefruchteten Oozyten im Metaphase II Stadium der weiblichen F_1. Als Grundlage der Dosierung der Testsubstanz dienten die in den vorangegangenen Untersuchungen erzielten Resultate. Zunächst wurde den Muttertieren 5 mg Mitomycin C/kg injiziert, da eine Applikation dieser Dosis während der präovulatorischen Phase zu Chromosomenaberrationen führte. Wie dargelegt (5.3.1.1.), wiesen 2,5% der Metaphasen II Aberrationen auf und sogar 44,5% mitotisch sich teilender Zellen des Knochenmarks waren davon betroffen (5.3.1.2.). Höhere Dosen konnten aufgrund der starken toxischen Wirkung auf die Foeten nicht eingesetzt werden.

Am auffälligsten (Tab.10) war die stark zytotoxische Wirkug des während der Pränatalentwicklung einwirkenden Mitomycins. So waren in der Kontrollgruppe 200 Oozyten im Metaphase II Stadium analysierbar, präpariert aus 62 Mäusen (3,2/Maus).

Um 200 Metaphasen von Mäusen analysieren zu können, die während ihrer Embryonalentwicklung am 7. Tag mit Mitomycin C diaplazentar behandelt worden waren, mußten 258 Weibchen aufgearbeitet werden (0,8/Maus).

Wirkte Mitomycin C auf Keimzellteilungen (Behandlung am 11. Tag), wurde die Oogenese total geblockt. Aus insgesamt 275 Weibchen, die im adulten Stadium aufgearbeitet wurden, konnte keine einzige Oozyte präpariert werden. Die Ovarien dieser Tiere wiesen makroskopisch erkennbare pathologische Veränderungen auf. Sie erreichten maximal die Hälfte normaler Ovariengröße. Follikel waren präpariermikroskopisch nicht erkennbar.

Tab.10: Chromosomenaberrationen in Oozyten diaplazentar behandelter Mäuse
5 mg Mitomycin C/kg; Applikation am 7., 11., oder 17. Tag p.c.

Serie	n Mäuse ♀♀ diaplazentar behandelt	n Metaphasen II analysiert	MII mit Aberrationen n	MII mit Aberrationen %	n Metaphasen II mit: G	B+F	D	E
Kontrolle	62	200	0	0	0	0	0	0
am 7. Tag	258	200	2	1,0*	0	1	0	1
am 11. Tag	275	0+						
am 17. Tag	248	100	3	3,0*	0	3	0	0

* $p > 0,05$ + Ovarien ohne Oozyten

Die diaplazentare Verabreichung am 17. Tag wirkte sich nicht so extrem zytotoxisch aus, reduzierte jedoch deutlich die Zahl auswertbarer Metaphasen II. So waren 100 Oozyten auswertbar, die aus 248 Mäusen präpariert worden waren (0,4/ Maus).

In den auswertbaren Oozyten behandelter Tiere war die Häufigkeit struktureller Aberrationen leicht gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Tab.10), in der sich in 200 Metaphasen II keine Aberrationen fanden. In 200 Metaphasen der am 7. Tag p.c. exponierten Mäuse wurde ein Chromatidbruch und ein Exchange vom Chromosomentyp gefunden. Die Häufigkeit struktureller Chromosomenaberrationen betrug somit 1,0%. In den 100 analysierten Metaphasen der am 17. Tag der Embryonalentwicklung behandelten Weibchen wurden 3 mit strukturellen Aberrationen gefunden. Hierbei handelte es sich um zwei Chromatidbrüche und ein Fragment. Die Häufigkeit der Metaphasen mit Aberrationen liegt mit 3,0% im Bereich der in den vorangegangenen Versuchen (Applikation in der präovulatorischen Phase; 5.3.1.1.) ermittelten Werte.

Wie dargelegt, wirkte sich die am 11. Tag p.c. applizierte Dosis von 5 mg Mitomycin C/kg so zytotoxisch aus, daß aus Mäusen, die das geschlechtsfähige Alter erreicht hatten, keine Oozyten gewonnen werden konnten. Um mögliche mutagene Effekte untersuchen zu können, wurde daher in weiteren Versuchen die Dosis reduziert, zunächst auf 2,5 mg/kg. Auch diese Dosis wirkte sich zytotoxisch aus und führte zu einer Degenerierung der sich am 11. Tag mitotisch teilenden Keimzellen. Bei 100 aufgearbeiteten Mäusen hatte keine Ovulation stattgefunden (Tab. 11). Auch eine weitere Reduzierung auf 1,25 mg/kg führte zum gleichen Ergebnis. Aus 100 diaplazentar behandelten Mäusen konnten keine Oozyten gewonnen werden. Erst die niedrige Dosis von 0,625 mg/kg ließ Oozyten zur Entwicklung kommen, und zwar waren 100 Metaphasen auswertbar, die aus 92 Tieren präpariert worden waren (1,1/Maus). 4% dieser Oozyten wiesen strukturelle Chromosomenaberrationen auf, wobei es sich um einen Bruch, ein Fragment, eine Deletion und einen Interchange handelte.

Tab.11: Chromosomenaberrationen in Oozyten diaplazentar behandelter Mäuse
Mitomycin C wurde trächtigen Mäusen am 11. Tag p.c. i.p. injiziert

Serie	n Mäuse ♀♀ diaplazentar behandelt	n Metaphasen II analysiert	MII mit Aberrationen n	%	n Metaphasen II mit: G	B+F	D	E
Kontrolle	62	200	0	0	0	0	0	0
5,000 mg/kg	275	0+						
2,500 mg/kg	100	0+						
1,250 mg/kg	100	0+						
0,625 mg/kg	92	100	4	4,0*	0	2	1	1

*p > 0,05 + Ovarien ohne Oozyten

6.3.3. Analyse von Zygotenstadien

Wie in Kapitel 5.3.1. dargestellt, induziert Mitomycin C, das während der präovulatorischen Phase injiziert wurde, strukturelle Chromosomenaberrationen. Hierzu waren jedoch Dosen im Bereich der LD_{50} und darüber notwendig. Desweiteren bleibt festzuhalten, daß die mutagene Wirkung auf unbefruchtete Oozyten minimal war, verglichen mit Effekten in mitotisch sich teilenden Zellen des Knochenmarks. Es wäre möglich, daß Mutationen in sehr viel stärkerem Maß als beobachtet auch in Oozyten induziert wurden, jedoch eine DNA-Synthese notwendig ist, um sie zu strukturellen Chromosomenaberrationen werden zu lassen. Zur Oberprüfung dieser Hypothese wurden behandelte Weibchen mit unbehandelten Männchen verpaart und anschließend Zygoten im Metaphasestadium der ersten postmeiotischen Teilung (=Pronukleusstadium) analysiert.

Die Chromosomen aus dem Kern der Oozyten einerseits und des Spermiums andererseits liegen zu diesem Zeitpunkt nach erfolgter erster postmeiotischer DNA-Synthese noch getrennt voneinander. Karyogamie hat noch nicht stattgefunden (Abb.20a). Da die aus der Oozyte stammenden Chromosomen meistens stärker kontrahiert sind als die vom Spermakopf übertragenen, ist es im Zygotenstadium noch möglich zwischen väterlichen (Abb.20b) und mütterlichen (Abb.20c) zu unterscheiden.

Chromosomenaberrationen traten in der Kontrollgruppe in 3 von 100 Metaphasen auf. Hierunter waren 2 Metaphasen mit Fragmenten und eine weitere mit einem Interchange (Tab.12).

Mitomycin C, in der präovulatorischen Phase appliziert, führte zu strukturellen Chromosomenaberrationen, nachweisbar im Zygotenstadium. Bereits die Injektion von nur 1,25 mg Mitomycin C/kg erhöhte in Zygoten die Häufigkeit analysierbarer struktureller Aberrationen, und zwar auf 7,0%. Wurde den Mäuseweibchen 2,5 mg/kg in der präovulatorischen Phase injiziert, so wurden in 36,0% aller Zygoten strukturelle Aberrationen gefunden. Hierunter fanden sich nicht nur Brüche und Fragmente, sowie Deletionen, sondern auch Interchange, und zwar überwiegend vom Chromosomentyp (Abb.21), multiple Aberrationen und fragmentierte Chromosomen (Abb.20). Während die Verabreichung von 5 mg/kg in Oozyten nur 2,5% Aberrationen induzierte (Tab.8), stieg die Häufigkeit in Zygoten sogar auf 41,0% an.

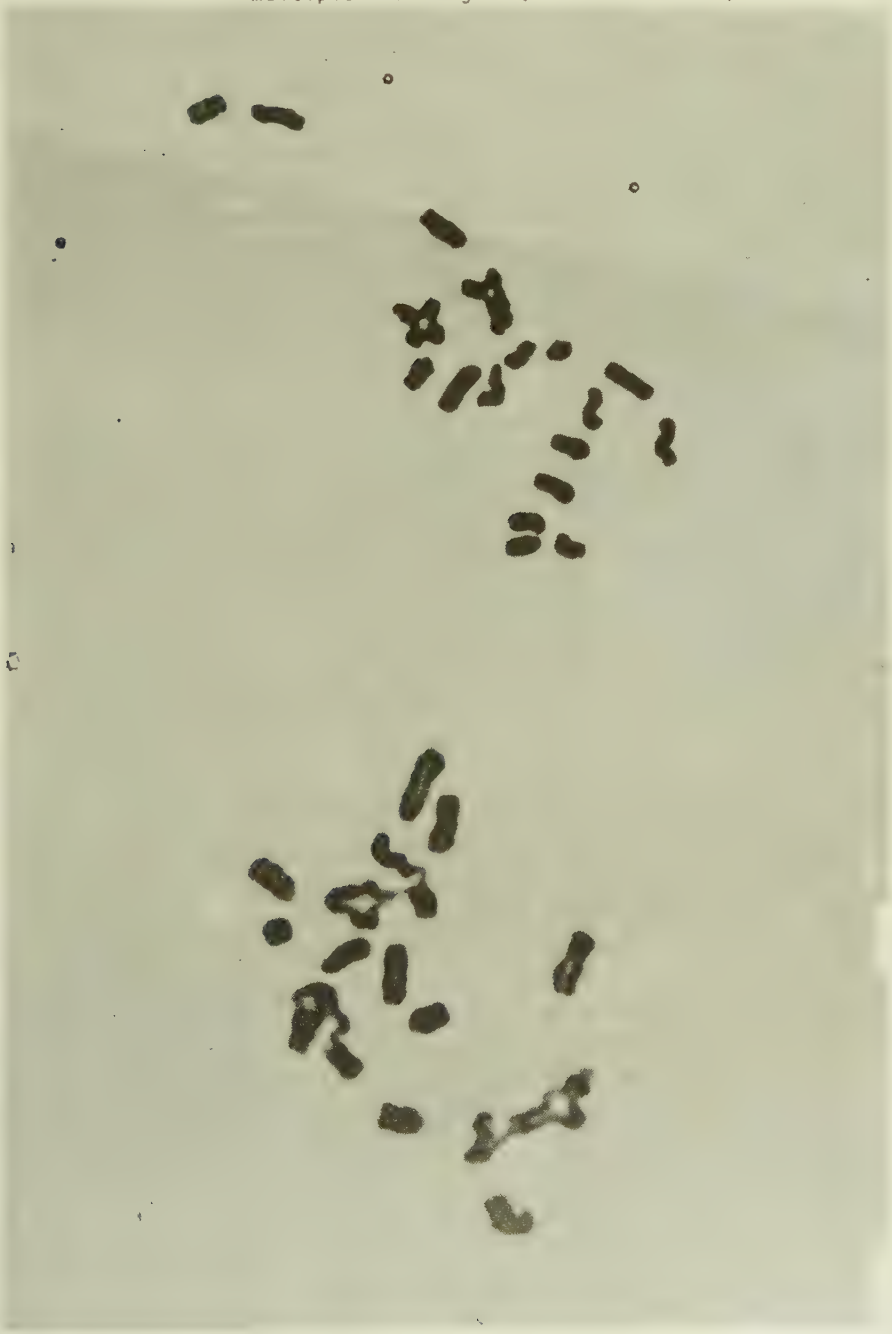
Abb.20: 1. postmeiotische Teilung (Zygotenstadium) nach Behandlung der Muttertiere

a) Obersicht

b) Ausschnitt: vom Spermium übertragene Chromosomen

c) Ausschnitt: von der Oozyte übertragene Chromosomen

Abb.21: Zygotenstadien - Mütterliche Chromosomen mit multiplen Exchanges (s. auch Abb. 26)



Tab.12: Chromosomenaberrationen in Zygoten der Maus
Mitomycin C; i.p.; nach der Applikation Verpaarung behandelter ♀♀ mit unbehandelten ♂♂

Serie	n Tiere	n Metaphasen analysiert	Metaphasen mit Aberrationen mit Gaps n	%	ohne Gaps n	%	Metaphasen mit: G	B+F	D	E	m.A.
Kontrolle	43	100	3	3,0	3	3,0	0	2	0	1	0
1,25 mg/kg	89	100	9	9,0	8	8,0	1	7	0	1	0
2,50 mg/kg	93	100	37	37,0*	36	36,0*	1	14	3	13	6
5,00 mg/kg	98	100	43	43,0*	41	41,0*	2	24	0	11	6

*$p < 0,05$

6.3.4. Voruntersuchungen zum präimplantativen Verlust

Zur Bestimmung des präimplantativen Verlustes wird üblicherweise nach Sektion der Muttertiere im Dominant-Letal-Test von der Zahl der bestimmten Corpora lutea die der Gesamtimplantate subtrahiert. Eine vergleichende Darstellung von Resultaten aus acht Laboratorien bei der Prüfung von Chemikalien auf Mutagenität mit dem Dominant-Letal-Test ergab jedoch, daß die Bestimmung der Corpora lutea und somit des präimplantativen Verlustes zu Fehlern führen kann (DYCKA, 1976). So lagen in einem Labor bei einem Drittel der untersuchten Tiere die Werte der Corpora lutea unter denen der Implantate.

Um die Resultate des mit dieser Methode zu ermittelnden (s.6.3.5.) präimplantativen Verlustes zu überprüfen, wurden trächtige Mäuse zu verschiedenen Zeiten nach der Verpaarung getötet, die präimplantativen Embryonen aus den Eileitern gespült (s. Abb.11-II) und die Zahl pro Weibchen bestimmt (Tab.13).

In der Kontrollgruppe fanden sich am 1. Tag p.c. um 10^{30}h im Mittel 12,8 Zygoten pro Weibchen in den Ampullen der Eileiter, zum Teil noch von Corona radiata-Zellen umgeben (eine Unterscheidung zwischen Oozyten und Zygoten ist ohne zytologische Aufarbeitung nicht möglich). In einer zweiten Serie wurden die Muttertiere erst am 2. Tag p.c. seziert und präimplantative Embryonen, die sich zu diesem Zeitpunkt im Zwei-Zell-Stadium befinden, aus den Eileitern gespült. Die Zahl der so ermittelten Zwei-Zell-Stadien betrug 10,2 pro Weibchen.

Die Ovulation wurde durch die einmalige Injektion von 5 mg Mitomycin C/kg während der präovulatorischen Phase nicht beeinflußt. 13,1 Oozyten bzw. Zygoten pro Weibchen wurden am 1. Tag p.c. gezählt. Obwohl 41,0% dieser Zygoten strukturelle Chromosomenaberrationen aufwiesen (Tab.12), hierunter neben Brüchen und Fragmenten auch Exchanges und multiple Aberrationen, war die Zellteilung nur geringfügig gehemmt. Pro Weibchen fanden sich durchschnittlich 10,1 Embryonen im Zwei-Zell-Stadium.

Tab.13: Untersuchungen zum präimplantativen Verlust.
Nach Injektion von Mitomycin C während der präovulatorischen Phase wurden behandelte Weibchen mit unbehandelten Männchen verpaart.

Serie	n ♀♀	Oozyten/Zygoten am 1. Tag p.c. um 10^{30}		n ♀♀	Zwei-Zell-Stadien am 2. Tag p.c. um 16^{00}	
		n	n/♀		n	n/♀
Kontrolle	40	512	12,8		408	10,2
5 mg/kg	40	524	13,1		404	10,1

6.3.5. Der Dominant-Letal-Test

6.3.5.1. Sektion am 13. Tag post coitum

Unbehandelte Männchen wurden im Verhältnis 1:2 mit Weibchen für die Dauer von bis zu 3 Tagen verpaart. Die Sektion der Muttertiere erfolgte am 13. Tag p.c.. Alle Parameter für die Auswertung des Dominant-Letal-Tests wurden aufgenommen, einschließlich der Auswertung der Corpora lutea (Tab.14).

Die Befruchtungsquote der Kontrollgruppe beträgt 52,5%. Aus den Befruchtungsquoten der mit Mitomycin C in der präovulatorischen Phase behandelten Weibchen läßt sich kein Einfluß der Behandlung in den Dosen bis 5 mg/kg feststellen. Der Prozentsatz beträgt nach Injektion von 2,5 mg/kg 47,5 und 55,0 nach Applikation von 5 mg/kg.

Die Zahl der Corpora lutea sank von 14,1 pro Weibchen in der Kontrollgruppe zwar leicht ab, jedoch nicht signifikant (Tab. 14b) und zeigte auch keine Dosisabhängigkeit.

Erste Hinweise auf eine mutagene Wirkung ergaben sich bei Zählung der Gesamtimplantate. Während in der Kontrollserie noch 13,4 Implantate pro Weibchen gefunden wurden, sank die Zahl auf 12,7 (2,5 mg/kg) beziehungsweise auf 11,2 (5 mg/kg) ab.

Demzufolge stieg der präimplantative Verlust (Corpora lutea minus Gesamtimplantate) von 0,7 pro Weibchen in der Kontrollgruppe auf 2,2 nach Injektion von 5 mg/kg.

Ebenfalls eine Dosisabhängigkeit wies die Häufigkeit toter und lebender Implantate auf, wobei bereits 2,5 mg/kg zu signi-

fikanten Unterschieden führte (Tab.14a,b). Während einerseits die Zahl der toten Implantate pro Weibchen von 0,4 über 1,2 auf 3,0 anstieg, sank die Zahl der lebenden Embryonen von 13,0 in der Kontrollgruppe auf 11,5 (2,5 mg/kg) und 8,1 (5 mg/kg) ab.

6.3.5.2. Sektion am 16. Tag post coitum

In einer weiteren Serie (Tab.14a,b) erfolgte die Sektion der Muttertiere erst am 16. Tag p.c.. Sowohl für die Befruchtungsquoten, die Zahl der Corpora lutea, Gesamtimplantate und den präimplantativen Verlust ergab sich ein ähnliches Resultat wie bei den am 13. Tag p.c. sezierten Tieren.

Die Befruchtungsquote lag zwischen 57,5% und 50,0%. In der Kontrollgruppe wurden 15,1 Corpora lutea pro Weibchen gezählt. Die Zahl sank nach Injektion von 2,5 mg Mitomycin C/kg auf 12,9 und auf 12,0 in der Versuchsserie mit 5 mg/kg.

Deutliche dosisabhängige Effekte wurden wiederum bei Zählung der Gesamtimplantate registriert. In der Kontrollgruppe wurden 14,0 Implantate pro Weibchen gezählt. Nur noch 11,5 fanden sich in der 2,5 mg/kg Dosisgruppe. Weibchen, die in der präovulatorischen Phase 5 mg Mitomycin C/kg injiziert bekommen hatten, wiesen nur noch durchschnittlich 10,3 Implantate auf. Die daraus berechnete Zahl für den präimplantativen Verlust stieg entsprechend an, und zwar von 1,2 pro Weibchen auf 1,4 (2,5 mg/kg) und 1,8 (5 mg/kg).

Hinsichtlich der Zahl lebender und toter Implantate ergaben sich Unterschiede bei Sektion der Muttertiere an verschiedenen Tagen post coitum. Bei einer Aufarbeitung am 16. Tag p.c. lag die Zahl der lebenden Embryonen pro Weibchen sowohl in der 2,5 als auch in der 5 mg/kg Dosisgruppe unter den Werten, die bei einer Sektion am 13. Tag p.c. ermittelt wurden. Andererseits war in beiden Fällen die Zahl der toten Implantate erhöht. So wurden bei einer Aufarbeitung am 16. Tag p.c. bei den Weibchen, die 5 mg/kg injiziert bekommen hatten, nur noch durchschnittlich 4,9 lebende Embryonen gefunden, während 5,4 tote Implantate gezählt wurden.

Tab.14a: DL-Test nach Behandlung weiblicher Mäuse mit Mitomycin C

Sektion am Tag	Dosis mg/kg	n ♀♀ verpaart	mit Implantaten n	%	Corpora lutea n	pro ♀	Gesamtimplantate n	pro ♀	präimplantat. Verlust n	pro ♀	tote Implantate früh abgestorben n	tote Implantate spät abgestorben n	tote Implantate gesamt n	pro ♀	lebende Embryonen n	pro ♀
	0	40	21	52,5	296	14,1	282	13,4	14	0,7	8	0	8	0,4	274	13,0
13	2,5	40	19	47,5	249	13,1	241	12,7	8	0,4	13	10	23	1,2	218	11,5
	5,0	40	22	55,0	294	13,4	246	11,2	48	2,2	52	15	67	3,0	179	8,1
	0	40	23	57,5	348	15,1	321	14,0	27	1,2	24	14	38	1,7	283	12,3
16	2,5	40	22	55,0	284	12,9	253	11,5	31	1,4	30	3	33	1,5	220	10,0
	5,0	40	20	50,0	240	12,0	205	10,3	35	1,8	90	17	107	5,4	98	4,9

Tab.14b: Berechnung dominanter Letalmutationen und statistische Auswertung des DL-Tests

Sektion am Tag	Dosis mg/kg	CLG (MW)	LEB/CLG (Median)	TOT/IMPL (Median)	PIE/CLG (Median)	DLM
	0	14,1	1,000	0,000	0,000	-
13	2,5	13,1	0,878*	0,060*	0,000	11,54
	5,0	13,4	0,573*	0,247*	0,144*	37,69
	0	15,1	0,909	0,071	0,000	-
16	2,5	12,9*	0,854	0,083	0,000	18,7
	5,0	12,0*	0,269*	0,500*	0,084*	60,2

Legende: CLG (MW): Corpora lutea graviditatis (Mittelwert)
LEB/IMP: Anzahl der lebenden Implantate/Anzahl der CLG
TOT/IMP: Anzahl der toten Implantate/Anzahl der Implantate
PIE/CLG: Anzahl der präimplantativen Eiverluste/Anzahl der CLG
DLM: dominante Letalmutationen berechnet nach EHLING et al. (1968)
*Signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (Alpha = 0,05). Auswertung nach VOLLMAR (1977)

6.3.6. Chromosomenaberrationen in lebenden Implantaten

Je 100 lebende Embryonen pro Dosisgruppe der am 13. und 16. Tag p.c. sezierten Muttertiere (5.3.5.2.) wurden zytologisch aufgearbeitet. Ausgewertet wurden jeweils 20 Metaphasen pro Embryo. Als von Mitomycin C in Oozyten induzierte und vererbte Mutationen wurden nur solche angesehen, die in allen Metaphasen des Embryos nachweisbar waren. Grund hierfür ist, daß eine in der Oozyte gesetzte Chromosomenaberration über die Zygote eingebracht wurde und daher in jeder Körperzelle identisch repliziert vorliegen muß.

Die Auswertung der mit Giemsa-Bandentechnik gefärbten Metaphasen (Abb.22) ermöglicht nicht nur das Auffinden der strukturellen Chromosomenaberrationen wie sie bisher beschrie-

ben wurden, sondern auch die Identifizierung von Inversionen und der Verlust einzelner Banden. Trotz Anwendung dieser relativ aufwendigen Färbetechnik wurden strukturelle Chromosomenaberrationen weder in beiden Kontrollserien (Aufarbeitung 13 und 16 Tage alter Embryonen) noch in den Versuchsserien beobachtet. Eins der 16 Tage alten Embryonen, dessen Muttertier mit 5 mg Mitomycin C/kg behandelt worden war, wies allerdings eine Monosomie auf.

In einer weiteren Versuchsserie wurden Mäuse, die 5 mg/kg injiziert bekommen hatten erst am 18. Tag p.c. seziert. Wiederum wurden in lebenden Embryonen keine strukturellen Chromosomenaberrationen gefunden. Andererseits trat auch in dieser Serie eine Monosomie auf und zwar fehlte bei einem der 100 aufgearbeiteten Embryonen in allen 20 analysierten Zellen eines der Chromosomen Nr. 19. Die P-Generation der Embryonen mit einer Monosomie wiesen weder eine Robertsonsche Translokation, aus der eine Monosomie resultieren könnte, noch sonstige Chromosomenanomalien auf.

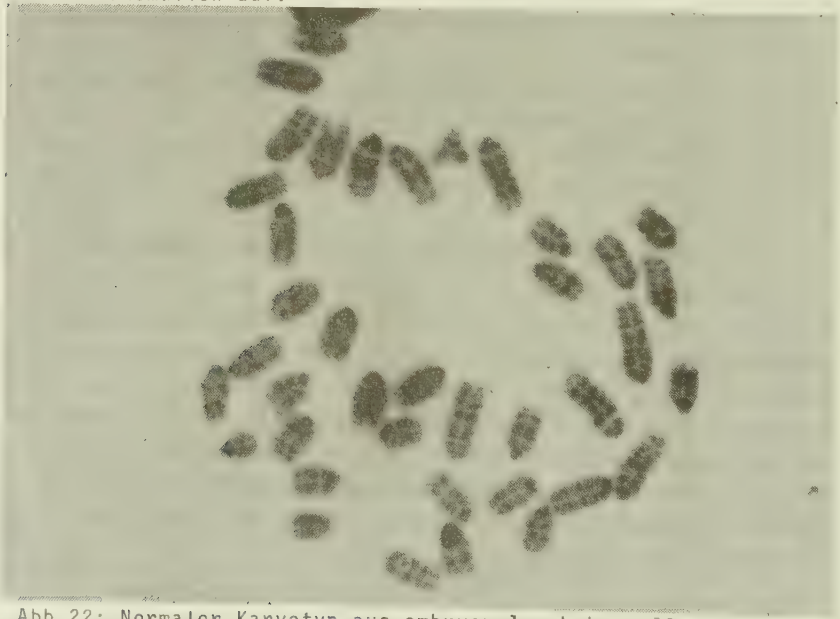


Abb.22: Normaler Karyotyp aus embryonalen Leberzellen eines 18 Tage alten Mäuseembryos

Tab.15: Chromosomenaberrationen in 13, 16 und 18 Tage alten lebenden Embryonen nach Behandlung der Muttertiere mit Mitomycin C unmittelbar vor der Verpaarung

Tag	Dosis mg/kg	n Muttertiere	n Embryos	n Embryos mit Aberrationen	n Embryos mit Aneuploidien
	0	10	100	0	0
13	2,5	11	100	0	0
	5,0	17	100	0	0
	0	9	100	0	0
16	2,5	10	100	0	0
	5,0	20	100	0	1
18	5,0	17	100	0	1

7. Diskussion

7.1. Der Oozytentest

In den 60er Jahren stand die Mutationsforschung stark unter dem Eindruck gerade erzielter molekulargenetischer Durchbrüche (WATSON u. CRICK, 1953). Die Erkenntnis, daß die DNA als Träger der Erbsubstanz bei allen Organismen nach dem gleichen Grundmuster gebaut ist und die molekularen Mechanismen der Mutationsauslösung bei allen Organismen gleiche Gültigkeit haben, ließ zunächst großen Optimismus hinsichtlich der Mutagenitätsprüfung entstehen. So glaubte man allein aufgrund der an Mikroorganismen, Drosophila oder Zellkulturen erhobenen Befunde Aussagen über das genetische Risiko beim Menschen machen zu können. Es erwies sich jedoch schon bald als unumgänglich, eine Reihe anderer Faktoren mitzudiskutieren: a) Zur Erfassung indirekter Mutagene ist es notwendig, Testsubstanzen zu verstoffwechseln. b) Repairmechanismen und Metabolisierung der Testsubstanzen (was sowohl zu einer Aktivierung als auch Inaktivierung führen kann) können beim Säuger zu Schwellenkonzentrationen führen, unterhalb derer ein Mutagen noch keinen Effekt zeigen wird. c) Um Benefit-Risk-Abschätzungen machen zu können ist unter anderem das Wissen über Dosis-Effekt-Beziehungen notwendig. d) Um Aussagen über das genetische Risiko der F_1 machen zu können, sind Untersuchungen an Keimzellen der Analyse von Zellen somatischer Gewebe vorzuziehen.

Erfüllt werden diese Forderungen an einen Mutagenitätstest von Oozytenuntersuchungen beim Säuger. Wie in Kapitel 3 (Literaturbefunde) dargelegt, liegen hierüber erst wenige Befunde vor, die zudem fast ausschließlich an der Maus erhoben wurden. Die zytogenetische Analyse von Metaphase II Chromosomen dieser Spezies wird durch den Umstand erschwert, daß sie nur akrozentrische Chromosomen mit fließenden Übergängen ihrer Größe besitzen.

So ist es aufgrund dieser Chromosomenmorphologie nicht möglich, Deletionen vom Isochromatidtyp zu identifizieren. Ebenso ist es unmöglich, Markerchromosomen zu identifizieren. Infolgedessen ist es ausgeschlossen, Aussagen zu machen, ob

bestimmte Chromosomen gehäuft strukturelle Aberrationen aufweisen oder an Non-disjunction Prozessen beteiligt sind.

Aus diesen Gründen wird der Chinesische Hamster (Cricetulus griseus) mit seinen morphologisch gut unterscheidbaren Chromosomen seit Jahren als bevorzugte Tierspezies eingesetzt bei der zytologischen Analyse von Chromosomen des Knochenmarks oder von Spermatogonien. Versuche, Oozyten des Chinesischen Hamsters mit in diese Untersuchungen einzubeziehen, waren nur bedingt erfolgreich (RODMAN u. BIEDLER, 1973; HANSMANN et al., 1974). So war es nicht möglich, den Östruszyklus zu synchronisieren. Auch nach Vorbehandlung durch Injektion lutenisierender Hormone wurden keine Verbesserungen erzielt.Die Oozyten der zur gleichen Zeit aufgearbeiteten Tiere befanden sich in den verschiedensten meiotischen Stadien. Desweiteren war es auch nicht möglich, eine Superovulation durch Hormongabe zu induzieren. Eine Erhöhung der Dosis des luteinisierenden Hormons erhöhte die Zahl der ovulierten Oozyten nicht (RODMAN u. BIEDLER, 1973).

Daher wurde versucht den Östruszyklus anhand von Vaginalabstrichen zu bestimmen. Es stellte sich jedoch heraus, daß es infolge der Vaginalabstriche zu Störungen des Östruszyklusses kommt und eine Ovulation zunächst ausbleibt (BASLER, unpubl.).

Beim Syrischen Hamster (Mesocricetus auratus) hingegen sind diese Schwierigkeiten zu umgehen. Am Morgen nach der in der Nacht erfolgten Ovulation tritt bei ihnen ein zähflüssiger, streng riechender Vaginalschleim auf, der auch ohne Vaginalabstriche erkennbar ist (EDWARDS u. GATES, 1959). Sein Vorkommen kennzeichnet somit den ersten des vier Tage dauernden Östruszyklusses.Eine erneute Ovulation findet in der Nacht des 4. Östrustages statt.

Dieser leicht bestimmbare Östruszyklus des Syrischen Hamsters wurde durch Hormongabe wie unter 5.4.1. beschrieben unterstützt. Dadurch ist sowohl eine exakte Synchronisation des meiotischen Verlaufs der Oogenese möglich, als auch, falls erforderlich, durch höhere Hormongabe die Auslösung einer Superovulation. Die Effektivität erwies sich mit der vorliegenden Arbeit, in der Oozyten von insgesamt 267 hormonvor-

behandelten Syrischen Hamstern präpariert wurden. Nur bei zweien dieser Tiere war keine Ovulation ausgelöst worden.

Während die Hormonvorbehandlung bei Syrischen Hamstern sich von der bei Mäusen hinsichtlich der Dosierung und Injektionszeiten unterscheidet, basiert die Präparationstechnik auf der für Mäuse beschriebenen (TARKOWSKI, 1966; RÖHRBORN u. HANSMANN, 1971) und konnte nach Modifikationen verwendet werden.

7.2. Die Induktion struktureller Chromosomenaberrationen durch Trenimon in Metaphase II Oozyten - Speziesvergleich -

DER ZEITLICHE ABLAUF MEIOTISCHER STADIEN BEI HORMONVORBEHANDELTEN SYRISCHEN HAMSTERN (6.1.) STIMMT EXAKT MIT DEM FÜR MÄUSE BESCHRIEBENEN (EDWARDS u. GATES, 1959) ÜBEREIN.

Dies ermöglicht den unmittelbaren Vergleich der beim Syrischen Hamster erzielten Resultate mit denen, die an der Maus erhoben wurden. Unter Verwendung von Trenimon konnte dieser Sensibilitätsvergleich erstellt werden und gleichzeitig die Anwendbarkeit des Oozytentests beim Syrischen Hamster aufgezeigt werden.

RÖHRBORN und HANSMANN (1971) untersuchten die mutagene Wirkung von Trenimon auf Metaphase II Oozyten von Mäusen des Stammes (101xC3H)F_1. Hierbei wurde 0,25 mg Trenimon/kg unter anderem 8 Stunden vor der HCG Gabe intraperitoneal injiziert. Die Analyse der 16 Stunden nach der HCG Gabe aufgearbeiteten Oozyten ergab 48,4% strukturell aberrante Metaphasen II (Abb. 23). In einem weiteren Versuch wurden von ihnen (HANSMANN et al., 1974) nach gleichem Versuchsaufbau Oozyten des Chinesischen Hamster präpariert. Als strukturelle Anomalien wurden überwiegend Brüche analysiert, daneben aber auch Fragmente, Deletionen und Chromatidtyp-Exchange. Die Häufigkeit der Oozyten mit strukturellen Aberrationen betrug 50% (Abb.23). Nicht angegeben wird von den Autoren die Zahl der im Versuch eingesetzten Hamster, um 56 Metaphase II Oozyten, auf denen die Resultate basieren, analysieren zu können. Aufgrund der Nichtsynchronisierbarkeit des Östrus (RODMAN u. BIEDLER, 1973) ist jedoch anzunehmen, daß sie weit über der verwendeter Mäuse und Syrischer Hamster liegt.

Wie dargelegt (6.2.1.1.), induziert Trenimon bei gleichem Versuchsaufbau auch in Metaphase II Oozyten des Syrischen Hamsters strukturelle Chromosomenaberrationen, und zwar in einer dosisabhängigen Weise. Die analysierten Aberrationen waren, wie beim Chinesischen Hamster (HANSMANN et al., 1974), fast ausschließlich vom Chromatidtyp, was aufgrund des Fehlens einer replikativen DNA-Synthese während der ovulatorischen Phase zu erwarten war.

Die Dosis von 0,25 mg Trenimon/kg, die bei Mäusen zu 48,4% strukturell aberranten Metaphasen II führte, beim Chinesischen Hamster sogar zu 50,0%, ließ beim Syrischen Hamster in 45,0% aller Oozyten Aberrationen entstehen. Während die Häufigkeit induzierter struktureller Chromosomenaberrationen bei allen drei Spezies im gleichen Größenbereich liegt, bestehen hinsichtlich des Vorkommens spontaner Aberrationen gravierende Unterschiede (Abb.23).

Mit nur einem Bruch in 200 analysierten Oozyten unbehandelter Syrischer Hamster, was einer Häufigkeit von 0,5% entspricht (Tab.2), sind spontan auftretende Chromosomenaberrationen in Metaphase II Chromosomen dieser Spezies selten eintretende Ereignisse. Beim Chinesischen Hamster hingegen ist dieser Wert mit 8,7% um mehr als das zehnfache erhöht. Hier traten sogar in unbehandelten Weibchen Chromatid-Exchanges auf. Die Aussagekraft dieses Aberrationstyps wird somit beim Auftreten in behandelten Tieren stark eingeschränkt. Gleiches gilt für die an $(101xC3H)F_1$ erhobenen Kontrolldaten. Auch hier traten neben Brüchen Interchange vom Chromatidtyp auf, und zwar in 11,1% aller Oozyten. Die spontane Häufigkeit für alle Aberrationstypen betrug bei der Maus 12,3%.

Aufgrund dieser Befunde kann folgender Schluß gezogen werden: Die als Versuchstiere eingesetzten $(101xC3H)F_1$ Mäuse, Chinesischen Hamster und Syrischen Hamster weisen keine Unterschiede auf hinsichtlich der Art und Häufigkeit Trenimon-induzierter struktureller Chromosomenaberrationen.

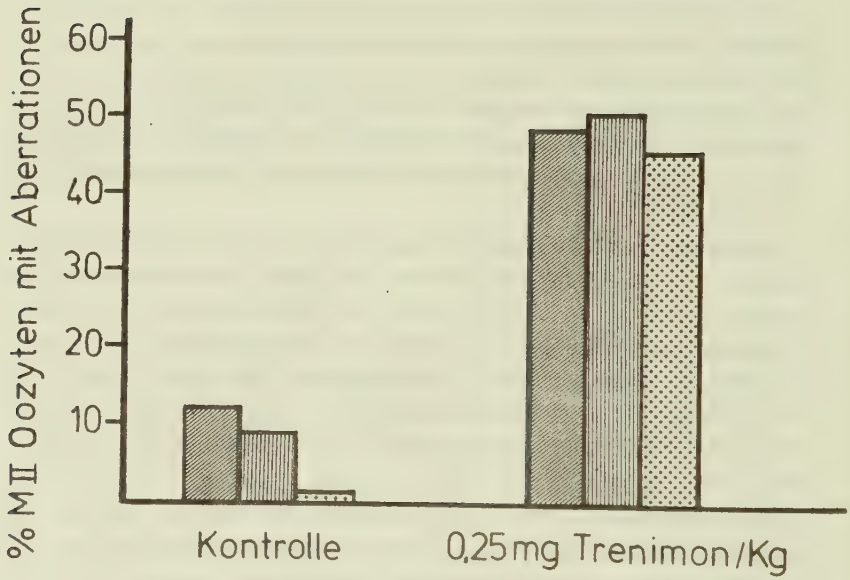


Abb.23: Die Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen in Metaphase II Oozyten durch Trenimon (0,25 mg/kg; i.p.; 8 h vor HCG). Die Befunde wurden erhoben an der Maus (RÖHRBORN u. HANSMANN, 1971), am Chinesischen Hamster (HANSMANN et al., 1974) und am Syrischen Hamster

SOMIT SCHEINT DER SYRISCHE HAMSTER DAS GEEIGNETE VERSUCHSTIER ZU SEIN ZUR ANALYSE VON METAPHASECHROMOSOMEN AUS OOZYTEN: A) AUFGRUND DES KARYOTYPS MIT DEN MORPHOLOGISCH VONEINANDER UNTERSCHEIDBAREN CHROMOSOMEN, VERGLICHEN MIT DER MAUS, B) DER MÖGLICHKEIT DEN ÖSTRUSZYKLUS ZU SYNCHRONISIEREN UND EINE SUPEROVULATION AUSZULÖSEN, WAS BEIM CHINESISCHEN HAMSTER NICHT MÖGLICH IST UND C) DEN NUR SELTEN AUFTRETENDEN SPONTANEN CHROMOSOMENABERRATIONEN, IM VERGLEICH SOWOHL ZUR MAUS ALS AUCH ZUM CHINESISCHEN HAMSTER.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit an Metaphase II Oozyten des Syrischen Hamsters Daten zur Dosis-Effekt-Beziehung erhoben nach einmaliger und subchronischer Injektion von Trenimon während der präovulatorischen Phase, sowie Untersuchungen zur Zeit-Wirkungs-Beziehung durchgeführt.

Trotz der geschilderten zytogenetischen Vorteile wurden Untersuchungen zur Stadiensensibilität an der Maus erhoben. Die Gründe hierfür sind, daß nur bei der Maus die Oogonienteilungen und die meiotischen Prophasestadien überwiegend synchron und voneinander getrennt ablaufen, nicht jedoch beim Syrischen Hamster (s. 2. Die Oogenese des Säugers).

7.3. Vergleich der an Oozyten und Zellen des Knochenmarks erhobenen Befunde nach einmaliger und subchronischer Injektion von Trenimon

In den meisten Untersuchungen zur mutagenen Wirkung von Chemikalien auf die Oogenese des Säugers wurden die Testsubstanzen nur einmal appliziert, und zwar während der präovulatorischen Phase, die sich als sensibel erwiesen hatte (RÖHRBORN u. HANSMANN, 1971). Eine ein- oder zweimalige Applikation von Dosen, die bis in den toxischen Bereich hineinreichen, ist sicherlich geeignet zur Prüfung von Chemikalien auf mögliche Mutagenität und zur Ermittlung von Dosis-Effekt-Beziehungen. Realitätsbezogener scheint hingegen eine subchronische oder chronische Verabreichung therapeutischer Dosen zu sein. Zytologische Analysen von Oozyten chronisch behandelter Säuger sind jedoch nur vereinzelt durchgeführt worden (BASLER et al., 1978; Seite, 1978), vielleicht aufgrund der wenig Erfolg versprechenden Befunde, die an Chromosomen des Knochenmarks erhoben wurden. SCHMID et al. (1971) z.B. verabreichten Chinesischen Hamstern das Alkylans Cyclophosphamid in therapeutischen Dosen von 8 mg pro kg für die Dauer von bis zu 7 Wochen. Die Häufigkeit aberranter Metaphasen des Knochenmarks blieb jedoch nahezu während des gesamten Experiments konstant; der Wert von 4% wurde nie überschritten. Das heißt, unter den gewählten Bedingungen nahm die Zahl aberranter Metaphasen nicht mit zunehmender chronischer Behandlungsdauer zu.

Diese negativen Befunde werden durch die hier vorliegenden Resultate bestätigt. Während eine einmalige Injektion von 0,031 mg Trenimon / kg in 2,75% aller Metaphasen des Knochenmarks strukturelle Chromsomenaberrationen (inklusive Gaps) induzierte und eine einmalige Dosis von 0,250 mg/kg sogar zu einer Erhöhung auf 41,75% führte (Tab. 3, Abb.24A), waren nach zehnmaliger Injektion von 0,025 mg/kg im 24 h Abstand nur 1,88% zu finden (Tab. 5, Abb. 24B).

Die Tatsache, daß Trenimon innerhalb weniger Stunden ausgeschieden wird und es zu keiner Akkumulierung im Körper kommt, kann sicherlich nicht die einzige Erklärung für die negativen Resultate nach zehnmaliger Injektion geringer Dosen sein. Es wäre möglich, daß Stammzellen mit multiplen Chromsomenaberrationen oder fragmentierten Chromosomen im weiteren Teilungsverlauf degenerieren. Daneben muß in Betracht gezogen werden, daß es durch die Ausschwemmung von Zellen in die Blutbahn zu einer raschen Elimination von Mutationen tragender Zellen des proliferierenden Gewebes kommt. Die Ausreifung von Proerythroblasten zu Normoblasten zum Beispiel, die aus dem Knochenmark in die Blutbahn treten, dauert nur 4-5 Tage. Nur die in den letzten Tagen einer chronischen Behandlung verabreichten Injektionen können somit zu im Knochenmark zytogenetisch nachweisbaren Mutationen führen.

Belege zu dieser Hypothese lieferten Untersuchungen zur Zeit-Wirkungs-Beziehung. Hierbei wurden 0,250 mg Trenimon/kg den Syrischen Hamstern einmal injiziert. Diese Dosis erwies sich in den vorangegangenen Untersuchungen zur Ermittlung von Dosis-Effekt-Beziehungen als stark mutagen (Tab.3). Bei einer Aufarbeitung 24 Stunden nach der Injektion wiesen 41,75% (Abb. 24A) aller Knochenmarksmetaphasen Chromosomenaberrationen auf. In 81% dieser Zellen mit Mutationen wurden sogar multiple Aberrationen gefunden. Nur wenige Tage später hatte sich das Bild vollständig geändert. Erfolgte die Aufarbeitung nämlich erst nach einer Woche, fanden sich keine Zellen mehr mit multiplen Aberrationen und nur noch in 1,50% der Zellen waren strukturelle Aberrationen analysierbar (Tab.7, Abb.24C). Bei noch späterer Aufarbeitung, das heißt vier Wochen nach Injektion des Mutagens, lagen die Werte ebenfalls bei 1,50% (Tab.7, Abb. 24D) und somit im Bereich der Kontrolle (Abb.24E).

VERBUNDEN MIT EINER DEGENERIERUNG VON STAMMZELLEN, SOWIE DEM REIFEN UND EINER AUSSCHWEMMUNG DER BLUTZELLEN, DAS HEIßT DEM ÜBERGANG DER NORMOBLASTEN, METAMYELOZYTEN UND MEGAKARYOZYTEN VOM KNOCHENMARK IN DIE BLUTBAHN, KOMMT ES IM KNOCHENMARK ZU EINER RASCHEN ELIMINATION PROLIFERIERENDER ZELLEN MIT CHROMOSOMENABERRATIONEN. EINE CHRONISCHE INJEKTION KANN DEMZUFOLGE IN DIESEM GEWEBE ZU KEINER WESENTLICHEN STEIGERUNG HINSICHTLICH MUTAGENER EFFEKTE FÜHREN, VERGLICHEN MIT EINER AKUTEN BEHANDLUNG.

Ausnahmen können allenfalls bei einer Akkumulation der Testsubstanz im Organismus einteten.

MIT ANDEREN RESULTATEN HINGEGEN IST BEI DER ANALYSE DER OOZYTEN IM METAPHASE II STADIUM CHRONISCH BEHANDELTER SYRISCHER HAMSTER ZU RECHNEN. DA SICH DIE OOZYTEN DES SÄUGERS VOM ZEITPUNKT DER GEBURT BIS ZUR OVULATION IN EINEM RUHESTADIUM BEFINDEN, DEM DIKTYOTÄN (s.2.), WÄRE ZU ERWARTEN, DAß INDUZIERTE ABERRATIONEN NICHT ELIMINIERT WERDEN KÖNNEN.

In diesem Testsystem sollten daher chronische Injektionen geringer Dosen zu einer Summation mutagener Effekte führen.

DIESE HYPOTHESE WURDE DURCH DIE DURCHGEFÜHRTEN VERSUCHE ZUM TEIL BESTÄTIGT.

Während in 200 Metaphasen unbehandelter Weibchen nur ein Bruch auftrat, die Häufigkeit struktureller Aberrationen somit 0,5% betrug, erhöhte sich der Wert nach zehnmaliger Applikation von nur 0,025 mg Trenimon/kg auf 16,0% (Abb.24B).

DIE ABERRATIONSHÄUFIGKEIT NACH SUBCHRONISCHER INJEKTION VON TRENIMON LIEGT SOMIT IN OOZYTEN UM EIN VIELFACHES HÖHER ALS IN ZELLEN DES KNOCHENMARKS.

Vergleicht man die Resultate jedoch mit denen der Serie, in der die Testsubstanz nur einmal, dafür aber in zehnfacher Dosierung während der präovulatorischen Phase verabreicht wurde, so traten relativ gesehen wenige Aberrationen auf (16,0% gegenüber 45,0%). Der Grund für die geringeren mutagenen Effekte könnte sein, daß die verabreichte Einzeldosis unterhalb einer Schwellenkonzentration liegt, so daß Reparaturmechanismen zum Teil noch wirksam sein können. Desweiteren wäre möglich, daß Mutationen tragende Oozyten während der zehntägigen Behandlung

degenerieren. Zur Klärung wurden Untersuchungen zur Zeit-Wirkungs-Beziehung durchgeführt. Hierzu wurde einmal 0,25 mg Trenimon/kg injiziert. Erfolgte die Applikation während der präovulatorische Phase (d.h. 8 Stunden vor HCG), so wiesen 45,0% der Oozyten strukturelle Aberrationen auf (Abb.24A). Erfolgte die Aufarbeitung der Oozyten erst acht Tage nach der Verabreichung der Testsubstanz (Injektion sieben Tage vor HCG), so fanden sich Aberrationen nur noch in 9% der analysierten Oozyten (Abb.24C). Ein weiteres (aber statistisch nicht signifikantes) Absinken auf 6% war zu beobachten, wenn 0,25 mg Trenimon/kg achtundzwanzig Tage vor der HCG Injektion verabreicht wurden (Abb.24D). Neben der Vermutung (RÖHRBORN u.HANSMANN, 1971; HANSMANN, 1974), daß die präovulatorische Phase sensibler als das Diktyotän sei, dürfte ein weiterer Faktor für das Absinken analysierbarer Mutationen verantwortlich sein.

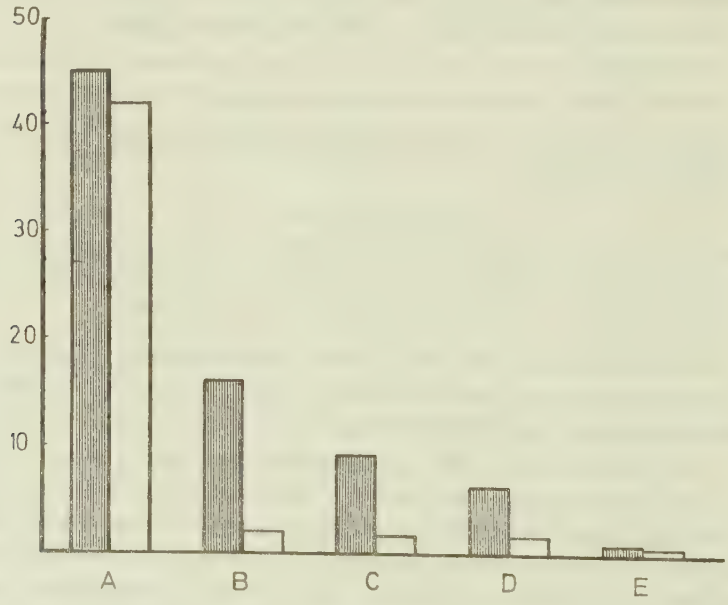


Abb.24: Die Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen im Knochenmark ☐ und in Oozyten ||||||| des Syrischen Hamsters durch Trenimon. A: 1x0,25 mg/kg 8 h vor HCG, B: 10x0,025 mg/kg im 24 h Abstand, C: 1x0,25 mg/kg 7 Tage vor HCG, D: 1x0,25 mg/kg 28 Tage vor HCG, E: Kontrolle

Wie nach Röntgenbestrahlung von Mäusen beobachtet (REICHERT et al., 1975b), war auch in den vorliegenden Versuchen die Zahl ovulierter und zytologisch auswertbarer Oozyten abhängig vom Zeitpunkt der Exposition. Wurde nämlich die Testsubstanz während der präovulatorischen Phase injiziert, so waren nur 13 Hamster notwendig, um 100 im Metaphase II Stadium auswertbare Oozyten präparieren zu können. Wirkte Trenimon hingegen auf das Diktyotän und erfolgte die Aufarbeitung der Oozyten erst vier Wochen später, so wurden 57 Weibchen benötigt, um die gleiche Zahl auswertbarer Metaphasen zu erhalten. Hieraus könnte der Schluß gezogen werden:

IM DIKTYOTÄN SCHWER GESCHÄDIGTE OOZYTEN, DAS HEIßT SOLCHE MIT DELETIONEN, EXCHANGES ODER FRAGMENTIERTEN CHROMOSOMEN, DEGENERIEREN ZUM TEIL, SIND NICHT IN DER LAGE IN DIE OVULATION EINZUTRETEN UND SOMIT NICHT ANALYSIERBAR.

Das würde bedeuten, daß im Metaphase II Stadium sehr viel weniger induzierte Aberrationen analysierbar waren als im Diktyotän induziert worden waren.

ZUR PRÜFUNG VON CHEMIKALIEN AUF MUTAGENITÄT MIT HILFE DES OOZYTENTESTS EMPFIEHLT ES SICH DAHER, WIE IN DEN MEISTEN UNTERSUCHUNGEN BISHER DURCHGEFÜHRT, DIE TESTSUBSTANZ NUR EINMAL, ALLERDINGS HOCH DOSIERT, WÄHREND DER PRÄOVULATORISCHEN PHASE ZU VERABREICHEN.

7.4. Mechanismen der Entstehung von Chromosomenaberrationen in Metaphase II Oozyten durch Trenimon

Die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung struktureller Aberrationen infolge der Einwirkung von Trenimon führen, sind weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, daß durch polyfunktionelle Alkylierung Crosslinks entstehen und zwar sowohl zwischen und innerhalb der DNA-Doppelhelix, als auch zwischen der DNA und Proteinen der Chromosomen. Es wurde beobachtet, daß durch Trenimon in somatisch sich teilenden Zellen ein "delayed effect" eintritt, das heißt, eine mutagene Wirkung erst nach erfolgter Replikation wirksam wird. Daher wird angenommen, daß eine S-Phase notwendig ist, um aus den induzierten Crosslinks strukturelle Chromosomenaberrationen werden zu lassen (OBE u. BEEK, 1979).

Diese Aussage steht jedoch im Widerspruch zu den an Oozyten der Maus (RÖHRBORN u. HANSMANN, 1971), des Chinesischen Hamsters (HANSMANN et al., 1974) und des Syrischen Hamsters erhobenen Befunden. In allen Fällen induziert Trenimon auch in einem nicht replizierenden System, das heißt in Oozyten während der Reifeteilung, strukturelle Chromosomenaberrationen.

Erst kürzlich konnte nachgewiesen werden (LINDEMANN u. HARBERS, 1980), wofür es seit längerem Hinweise gab (ELMORE et al., 1948; RENIER u. ZAMENHOF, 1957; ROSS, 1962; STACEY et al., 1958), daß der Hauptangriffspunkt einiger alkylierender Pharmaka die Phosphodiesterbrücken in der DNA sind. Die solchermaßen gebildeten Phosphorsäuretriester sind allerdings instabil und werden durch Abspaltung der Alkylgruppe oder durch Brüche in der Nukleotidkette zwischen Phosphor und Desoxyribose (RÖHRBORN, 1960; 1970a; Abb.25) stabilisiert.

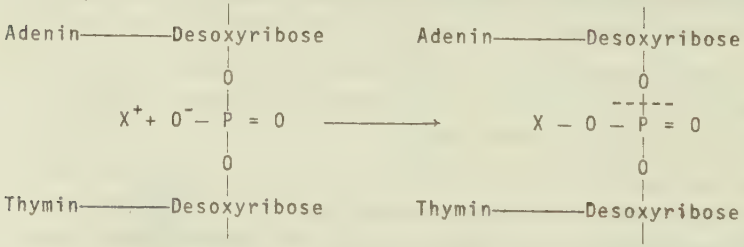


Abb.25: Alkylierung der Phosphoribose. Durch Bruch zwischen Phosphor und Desoxyribose Stabilisierung des zuvor entstandenen instabilen Phosphorsäuretriesters (nach RÖHRBORN, 1970a) ----- Bruchstelle

Diese geschilderte Alkylierungsreaktion allein bedürfte wiederum einer Replikation, um die DNA-Einzelstrangläsion zu einer Chromosomenaberration werden zu lassen. RÖHRBORN (1960, 1970a) fand jedoch, daß sich durch das Zytostatikum Cyclophosphamid auch in Spermien von Drosophila Chromosomenaberrationen induzieren ließen. Als mögliche Erklärung dieser Befunde postulierte er, daß bifunktionelle alkyierende Agentien auch Crosslinks entstehen lassen unter Alkylierung gegenüberliegender Phosphorylgruppen. Die beiden gebildeten instabilen Phosphorsäuretriester werden durch zwei Brüche in der Polynukleotidkette stabilisiert. Dadurch werden aus beiden Strängen interkalare Abschnitte nach Induktion mehrerer Crosslinks herausgelöst, oder aber terminale Abschnitte.

MIT DIESEM VON RÖHRBORN (1960, 1970A) GESCHILDERTEN MODELL IST DIE INDUKTION STRUKTURELLER CHROMOSOMENABERRATIONEN MIT POLYFUNKTIONELLEN AGENZIEN AUCH IN NICHTREPLIZIERENDEN SYSTEMEN ERKLÄRBAR, ALSO AUCH IN OVULATORISCHEN OOZYTEN DES SÄUGERS DURCH TRENIMON, WIE IN DER VORLIEGENDEN ARBEIT AUFGEZEIGT.

Ob allerdings auch Reunionsprozesse ablaufen können, also Exchangefiguren wie Ringchromosomen, Inversionen oder Translokationen entstehen können, war lange Zeit ungeklärt und wurder verschiedentlich in Frage gestellt.

MASUI und PEDERSEN (1975), PEDERSEN und MANGIA (1978), sowie BRAZILL und MASUI (1978) wiesen jedoch mit Hilfe autoradiografischer Verfahren das Vorkommen einer Reparatur-Synthese, der sogenannten unscheduled DNA-Synthese, auch in nicht mitotisch sich teilenden Oozyten des Säugers nach.

IN DER VORLIEGENDEN ARBEIT SCHLIEßLICH WAREN INTERCHANGE, DIE RESULTATE FEHLERHAFTER REPARATUREN NACH INDUKTION VON CHROMATIDENBRÜCHEN WÄHREND DES DIKTYOTÄNS SIND, AUCH IN METAPHASE II OOZYTEN DES SYRISCHEN HAMSTERS ZYTOLOGISCH ANALYSIERBAR.

7.5. Das Non-disjunction Problem

Während bei den verschiedenen Säugerspezies Aneuploidien spontan äußerst selten auftreten (Tab.16), sind sie beim Menschen die Hauptursache spontan auftretender Frühaborte und chromosomal bedingter Fehlbildungs-Syndrome. So wurde errechnet, daß der Anteil an Chromosomenanomalien unter den klinisch erfaßbaren Aborten ca. 50% beträgt (CARR u. GEDEON, 1977) und unter diesen Trisomien überwiegen (50%), gefolgt von Monosomien des X Chromosoms (18%), Triploidien (17%) und Tetraploidien (6%) (SANKARANARAYANAN, 1979). Diese Unterschiede ließen HANSMANN und EL-NAHASS (1979) vermuten, daß die beim Menschen auftretenden Aneuploidien überwiegend auf eine Fehlverteilung während der zweiten meiotischen Teilung oder der Teilung nach der Zygotenbildung zurückzuführen sind. Gegen erstere Vermutung spricht jedoch, daß Hyperploidien auch in den Zygoten der Maus (Tab.12) nicht gefunden wurden. Mögliche Unterschiede in der Chromosomenstruktur dürften ebenfalls als Erklärung ausscheiden, da auch beim Syrischen Hamster (der in seinem

Karyotyp - s. Abb.14 - neben akrozentrischen Chromosomen meta-, submeta- und subtelozentrische aufweist wie der Mensch) Trisomien selten auftretende Ereignisse sind (Tab.16).

Die Erklärung der unterschiedlichen Spontanwerte dürfte sein, daß Non-disjunction Prozesse erst bei höherem mütterlichen Alter gehäuft ablaufen, verbunden mit sinkender Chiasmata-Frequenz (HENDERSON u. EDWARDS, 1968; LUTHARDT et al., 1973; JAGIELLO et al., 1974; SPEED, 1977). Diese beim Menschen hinlänglich bekannte Altersabhängigkeit konnte auch bei Säugetieren nachgewiesen werden (RÖHRBORN, 1972, 1975; MARTIN et al., 1976; CHEBOTAR, 1976a,b, 1978).

SOMIT SIND DIE UNTERSCHIEDE HINSICHTLICH DER HÄUFIGKEIT SPONTAN AUFTRETENDER NON-DISJUNCTION PROZESSE NICHT SPEZIES-, SONDERN ALTERSBEDINGT.

Daneben muß jedoch auch in Betracht gezogen werden, daß der Mensch einer großen Zahl exogener Faktoren exponiert ist, wie zum Beispiel Umweltchemikalien.

OB ALLERDINGS DIE IN DIESER ARBEIT EINGESETZTEN ALKYLIERENDEN AGENTIEN NON-DISJUNCTION ZU INDUZIEREN VERMÖGEN, KONNTE NICHT EINDEUTIG GEKLÄRT WERDEN.

WÄHREND TRENIMON IN ALL DIESEN UNTERSUCHUNGEN STRUKTURELLE CHROMOSOMENABERRATIONEN NACHWEISBAR INDUZIERTE, FANDEN SICH HYPERPLOIDIEN WEDER IN DER KONTROLLSERIE, NOCH NACH INJEKTION VON TRENIMON.

Bei Mäusen des Stammes (101xC3H)F_1 hingegen ließ die einmalige Injektion von 0,25 mg Trenimon/kg 8 Stunden vor der HCG Applikation Hyperploidien in 12,5% der Metaphase II Oozyten entstehen und sogar 26,2% bei Applikation der Testsubstanz zusammen mit HCG (RÖHRBORN u. HANSMANN, 1971). Bezüglich hoher Werte an Hyperploidien vermutet RUSSELL (1979), daß einige der hyperploiden Chromosomen auf Artefakte zurückzuführen sind, eventuell dem Polkörper entstammen (POLANI u. JAGIELLO, 1976). Wahrscheinlicher aber sind die Gründe zahlreicher Trisomien in der Häufigkeit spontan auftretender Hyperploidien zu suchen, die bei Mäusen des verwendeten Stammes 6,3% betrug. Spätere Untersuchungen an diesem Stamm bestätigten diese Befunde jedo

nicht. Sowohl mit, als auch ohne Hormonvorbehandlung, betrug die Häufigkeit spontan auftretender Oozyten mit 21 anstatt regulär 20 Chromosomen nur 0 bis 0,5% (HANSMANN u. EL-NAHASS, 1979; BASLER unbubl., Tab.16). Diese letzteren Befunde stehen im Einklang mit allen an verschiedenen Stämmen der Säugerspezies Syrischer Hamster, Chinesischer Hamster und Maus erhobenen Befunde (Tab.16), in denen die Werte immer deutlich unter 1% lagen, in den meisten Fällen sogar bei 0%.

FRAGLICH IST AUCH, OB MITOMYCIN C NON-DISJUNCTION ZU INDUZIEREN VERMAG.

Nach Injektion von 5 mg Mitomycin C/kg traten Hyperploidien in 2 von 441 Metaphase II Oozyten der Maus auf, was in den Kontrollserien nie beobachtet wurde. Diese Erhöhung ist statistisch nicht signifikant. Hält man sich jedoch vor Augen, daß unter 1070 analysierten Oozyten von 400 unbehandelten Mäusen des gleichen Stammes NMRI, aufgearbeitet in den Jahren 1975 bis 1979 (Kontrollpool; Tab.16), nicht eine hyperploide Metaphase II gefunden wurde, so erhalten diese Daten eine andere Wertung.

Nicht gewertet wurden bei der zytogenetischen Analyse auftretende Hypoploidien, da diese durch das Wegschwimmen einzelner Chromosomen bei der Fixierung der Oozyten entstanden sein könnten. Statistisch gesehen wäre jedoch mit der gleichen Zahl hypoploider wie hyperploider Metaphasen II zu rechnen. CHANDLEY und SPEED (1979) vermochten auch aufzuzeigen, daß Hypoploidien durch Mitomycin C induziert und vererbt werden. Sie verabreichten männlichen Mäusen eine einmalige Injektion von 2 mg Mitomycin C/kg, verpaarten sie 5 Wochen später mit unbehandelten Weibchen und analysierten somatische Zellen 9-10 Tage alter Embryonen. Während über strukturelle Chromosomenaberrationen keine Angaben gemacht wurden, fanden sie in 2 von 325 F_1 Embryonen eine Monosomie des X-Chromosoms. Die Autoren vermochten jedoch nicht mit Sicherheit einen Artefakt als Ursache des Fehlens eines Chromosoms auszuschließen. In der vorliegenden Arbeit aber, in der weiblichen Tieren vor der Verpaarung Mitomycin C injiziert worden war, fand sich unter 16 und 18 Tage alten lebenden Embryonen ebenfalls je ein Embryo mit einer Monosomie, nie jedoch in den Kontrollserien. Da das Fehlen in

Tab.16: Häufigkeit spontan auftretender Hyperploidien in Oozyten des Säugers

Untersucher	Hormonvor-behandlung	Spezies	n Oozyten analysiert	Oozyten hyperploid n	%
Basler (vorliegende Arbeit)	+	Syrischer Hamster	200	0	0
Hansmann, Probeck, 1979a	+	"	307	0	0
Watanabe et al., 1979	-	"	143	1	0,7
Hansmann et al., 1975a	+	Chinesischer Hamster	220	0	0
Hansmann, Probeck, 1979a	+	"	125	0	0
" 1979b	+	"	121	0	0
Röhrborn, Hansmann, 1971	+	Maus; (101xC3H)F_1	81	5	6,2
Hansmann, El-Nahass, 1979	+	" "	413	2	0,5
"	-	" "	329	1	0,3
Basler (unpubl.)	+	" "	100	0	0
Reichert et al., 1975b	+	" NMRI	143	0	0
Becker, Schöneich, 1977	-	" "	410	2	0,5
Seite, 1978	-	" "	202	0	0
Theiss, 1979	+	" "	114	0	0
Hansmann, El-Nahass, 1979	+	" "	932	2	0,2
" "	-	" "	438	1	0,2
Basler (Kontrollpool 1975-1979)	+	" "	1070	0	0
Basler (vorliegende Arbeit)	+	" "	362	0	0
Uchida, Lee, 1974	-	" (C3HxICR/Swiss)F_1	1054	0	0
Uchida, Freeman, 1977	-	" "	2267	4	0,2
Hansmann, El-Nahass, 1979	-	" C3H/HeHan	413	1	0,2
"	+	" "	891	3	0,3
Shimada et al., 1976	+	" ddy	199	0	0

allen 20 analysierten Zellen der Embryonen registriert wurde, scheidet ein auf die zweistündige Kultivierung zurückgehender Fehler sicher aus.

7.6. Mechanismen der Entstehung von Chromosomenaberrationen durch Mitomycin C - Vergleich der Befunde an Oozyten, Zygoten und Zellen des Knochenmarks

Die für Trenimon geschilderten Reaktionsmechanismen, eine Induktion von Crosslinks unter Alkylierung gegenüberliegender Phosphorylgruppen, können durch das Zytostatikum Mitomycin C aufgrund der Struktur und Größe des Moleküls (OGAWA et al., 1979) nicht ausgelöst werden. Schon der geringe Abstand von 2,9 A° (ARORA, 1979) zwischen C1 des Acridins und dem C10 der Carbamatgruppe, den reaktiven Stellen des Alkylans, lassen eine solche Alkylierung nicht zu. Aufbauend auf den grundlegenden Arbeiten von SZYBALSKI und IYER (1964, 1967) deuten alle neueren Untersuchungen (ARORA, 1979; LOWN, 1979; TOMASZ u. LIPMAN, 1979) darauf hin, daß nach Aufnahme und enzymatischer Reduktion von Mitomycin C die Basen der DNA alkyliert werden. Dabei wird sowohl eine bifunktionelle Alkylierung unter Entstehung von Crosslinks (IYER u. SZYBALSKI, 1963; WEISSBACH u. LISIO, 1965; LOWN, 1979; ARORA, 1979) diskutiert, als auch die zum überwiegenden Teil stattfindende (SZYBALSKI u. IYER, 1964 WEISSBACH u. LISIO, 1965) monoalkylierende Wirkung (LOWN, 1979). Diese auf molekularer Ebene induzierten Mutationen vermögen sowohl die Funktion und Verteilung der DNA zu beeinträchtigen und somit zytotoxisch wirksam sein als auch zu strukturellen Chromosomenaberrationen führen, wie sie von MERZ (1961) erstmals beschrieben wurden. Für letzteren Schritt bieten sich verschiedene Modellvorstellungen an:

a) Durch Alkylierung des Guanins als reaktivstem nukleophilem Zentrum entsteht Alkylguanin. Im Gefolge dieses Initialprozesses wird Alkylguanin durch Bruch der Desoxyribosebindung von der Zucker-Phosphatkette der DNA gelöst, worauf es dann schließlich zum Bruch der Zucker-Phosphatkette selbst kommen kann (RIEGER u. MICHAELIS, 1967). Im Gefolge eines Bruches kann es zu einer Degradierung eines Abschnittes der DNA-Doppelhelix kommen. Falls keine Reparatur der DNA-Einzelstrangläsion stattfindet, entsteht daraus nach erfolgter Re-

plikation ein in der Metaphase sichtbarer Chromatidbruch.

b) Da das Excision-Repair-System auch alkylierte Basen aus der DNA zu eliminieren vermag (ROBERTS, 1975), dürfte eine zweite Möglichkeit der Bruchentstehung auf eine unvollständige Excision-Reparatur zurückzuführen sein. Der erste Schritt ist hierbei die Erkennung alkylierter Basen durch Endonukleasen und ein Aufschneiden des betroffenen Stranges der DNA-Doppelhelix. Somit werden freie Enden geschaffen, die als Ansatzpunkt für den Abbau von Nukleotiden durch eine Exonuklease dienen. Werden durch DNA-Polymerasen die von der Nuklease abgebauten Abschnitte nicht wieder neu synthetisiert, oder unterbleibt die Verbindung benachbarter Nukleotide durch Ligase, so entsteht wiederum nach erfolgter DNA-Replikation ein Bruch vom Chromatidtyp.

c) Liegen infolge mehrerer Alkylierungen in einem Chromosom Einzelstrangläsionen (entstanden wie unter a oder b beschrieben) in den Schwestersträngen der DNA-Doppelhelix einander annähernd gegenüber , sind Chromatidbrüche auch ohne anschließende Replikation zu erwarten.

d) Liegen die Einzelstrangläsionen dicht beieinander, aber in verschiedenen Chromosomen, so können bei gleichzeitig ablaufender Reparatur fehlerhafte Verbindungen freier DNA-Enden entstehen, die in der Metaphase als Exchange analysierbar sind (BRØGGER u. JOHANSEN, 1972; Abb.26).

Die Wahrscheinlichkeit, daß in einem Chromosom einander annähernd gegenüberliegende Basen alkyliert werden und somit Brüche ohne anschließende Replikation entstehen können (c) ist sehr viel geringer als die auf Einzelstrangläsion zurückzuführende Chromosomenaberration (a,b). Daher ist zu erwarten, daß Mitomycin C in einem nichtreplizierenden System keine oder nur wenige strukturelle Chromosomenaberrationen entstehen läßt, im Gegensatz zu proliferierenden Zellen.

Geprüft wurde dies, indem weiblichen Mäusen Mitomycin C während der präovulatorischen Phase injiziert wurde und sowohl Chromosomen aus Oozyten im Metaphase II Stadium (Abb.27A), als auch Zellen aus dem Knochenmark (Abb.27C), analysiert wurden.

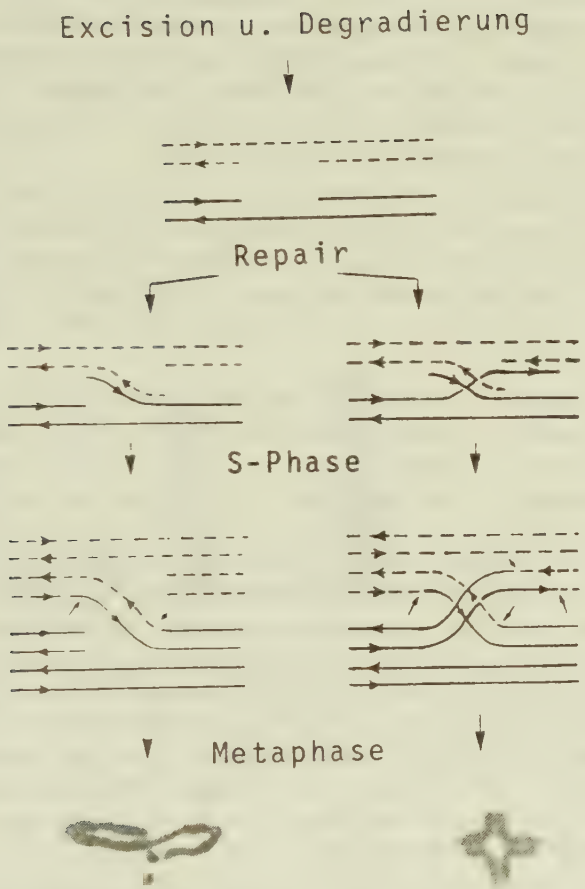


Abb.26: Die Entstehung struktureller Chromosomenaberrationen nach Alkylierung der DNA durch Mitomycin C (nach BRØGGER u. JOHANSEN, 1972)
links: Chromosomen aus dem Knochenmark mit unvollständigem Exchange und zwei Fragmenten (Ausschnitt aus Abb.19a)
rechts: Chromosomen der ersten mitotischen Teilung (Zygotenstadium) mit vollständigem Exchange (Ausschnitt aus Abb. 21)

In der Kontrollgruppe wurden in 362 Metaphase II Oozyten keine Aberrationen festgestellt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren an Mäusen dieses Stammes NMRI durchgeführten Untersuchungen (BASLER u. RÖHRBORN, 1976; BASLER et al., 1977b, 1979; SEITE, 1978), in denen ebenfalls die Häufigkeit struktureller Aberrationen immer unter 1% lag.

Die verabreichten Dosen von Mitomycin C lagen zwischen 5 und 20 mg/kg, überstiegen mit der höchsten Dosis also die LD_{50} um ein vielfaches. Ermöglicht wurde die Verwendung extrem hoher Dosen dadurch, daß die Aufarbeitung der Versuchstiere in diesen Experimenten bereits 16 Stunden nach Injektion der Testsubstanz erfolgte.

Die im Metaphase II Stadium analysierbaren strukturellen Aberrationen waren fast ausschließlich vom Chromatidtyp, wobei Brüche und Fragmente überwogen. Auffällig häufig wurde, wie auch in Spermatogonien der Maus (ADLER, 1974), der Verlust einer Chromatide beobachtet. Wie in Kapitel 4.2.3. besprochen, liegen bei allen untersuchten Organismen die von Mitomycin C induzierten strukturellen Chromosomenaberrationen nicht-randomisiert vor, sondern sind überwiegend in den heterochromatischen Abschnitten lokalisiert. Diese Untersuchungen sprechen dafür, daß die relativ häufig gefundenen Chromatidverluste auf die bevorzugte Induktion von Brüchen im Heterochromatin zurückzuführen sind, das sich bei der Maus im zentromernahen Bereich befindet (JONES, 1970). Da Mäuse des Stammes nur akrozentrische Chromosomen aufweisen, führen Brüche in diesem Bereich zum völligen Verlust einer Chromatide.

Zwar wurden nach Injektion der Testsubstanz während der präovulatorischen Phase strukturelle Chromosomenaberrationen in Metaphase II Oozyten gefunden, jedoch sind die Effekte als gering zu betrachten im Vergleich (Abb.27) zu den an mitotisch sich teilenden Zellen des Knochenmarks erhobenen Befunden. In diesen proliferierenden Zellen wurden strukturelle Chromosomenaberrationen in einer dosisabhängigen Weise induziert. Bereits 1,25 mg/kg führten zu mehr als einer Verzehnfachung der Spontanrate. Die als höchste Dosis injizierten 10 mg/kg induzierten bereits in 87,8% aller Zellen strukturelle Aberrationen, von denen nahezu die Hälfte fragmentierte Chromosomen aufwies.

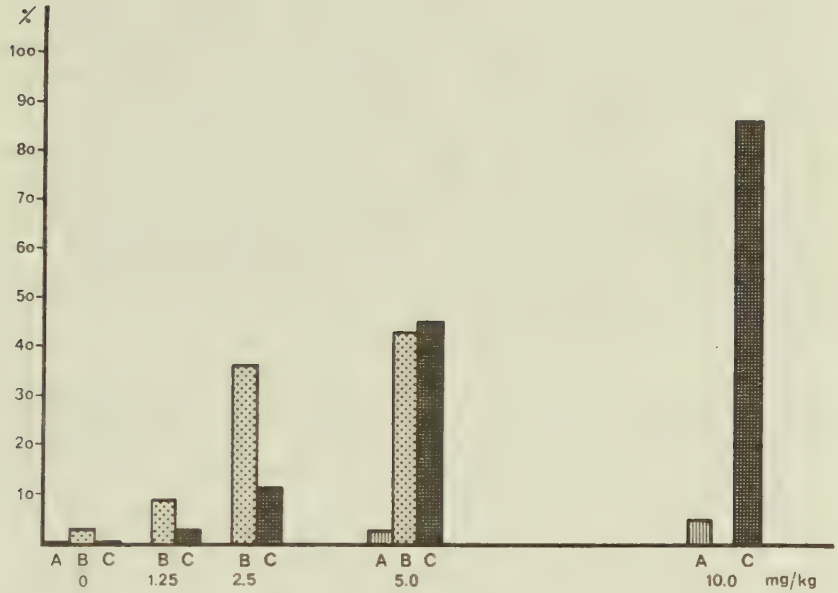


Abb.27: Strukturelle Chromosomenaberrationen inklusive Gaps in Metaphase II Oozyten (A), in Zygoten (B) und in Zellen des Knochenmarks (C) nach Applikation von Mitomycin C während der präovulatorischen Phase

Es wäre denkbar, daß die unterschiedlichen Resultate im Knochenmark und in Oozyten auf Sensibilitätsunterschiede zurückzuführen sind, resultierend aus einer möglicherweise schützenden Wirkung der die Oozyten umgebenden Zona pellucida (JAGIELLO u. LIN, 1973). Durch Analysen von Zygotenstadien konnte dies jedoch ausgeschlossen werden. Dazu wurde die Testsubstanz wie in den vorherigen Versuchen während der präovulatorischen Phase injiziert, so daß wiederum Diktyotän-Oozyten betroffen wurden. Nach Verpaarung der Weibchen mit unbehandelten Männchen erfolgte die zytogenetische Analyse jedoch erst an Zygoten im Metaphasestadium der ersten mitotischen Teilung.

Um im Zygotenstadium zwischen dem vom Spermakopf eingebrachten Chromosomensatz und solchem der Oozyte unterscheiden zu

können, verwendeten FRASER und MAUDLIN (1979) zunächst zur Verpaarung männliche CBA/T6 Mäuse, die ein T6 Markerchromosom aufweisen. Die vom Vater und der Mutter stammenden Chromosomen weisen im Zygotenstadium jedoch noch einen unterschiedlichen Kondensationszustand auf, wie zuvor von McGAUGHEY und CHANG (1971), DONAHUE (1972b), HANSMANN (1973) sowie BREWEN et al. (1975) an verschiedenen Mäusestämmen beobachtet. Diese auch bei Mäusen des Stammes NMRI auftretende Eigenschaft ermöglicht auch ohne Verwendung von Markerchromosomen in einem der haploiden Chromosomensätze eine Unterscheidung (Abb.20). In allen Fällen, in denen eine Zuordnung eindeutig möglich war, entstammten die Chromosomen mit strukturellen Chromosomenaberrationen der Oozyte (Abb.20c).

Während die Applikation von Mitomycin C während der präovulatorischen Phase nur wenige strukturelle Chromosomenaberrationen in Oozyten entstehen ließ, fanden sie sich in Zygoten in eindeutig dosisabhängiger Weise (Abb.27B). So wiesen nach Applikation von 5 mg Mitomycin C/kg nur 2,5% der Oozyten strukturelle Chromosomenaberrationen auf, hingegen 43,0% der Metaphasen im Zygotenstadium. Auch erwiesen sich in den Versuchsserien mit gleicher Dosierung (1,25; 2,5 und 5 mg/kg) Zygoten als mindestens ebenso sensibel wie Zellen des Knochenmarks (Abb.27C).

SOMIT BESTÄTIGTE SICH DIE HYPOTHESE, DAß DIE DNA IN DIKTYOTÄN-OOZYTEN IM GLEICHEN MAßE DURCH MITOMYCIN C ALKYLIERT WIRD WIE DIE DER ZELLEN DES KNOCHENMARKS, EINE REPLIKATIVE DNA SYNTHESE JEDOCH NOTWENDIG IST, UM AUS DEN IN OOZYTEN INDUZIERTEN EINZELSTRANGLÄSIONEN STRUKTURELLE CHROMOSOMENABERRATIONEN WERDEN ZU LASSEN.

Diese Resultate lassen einige an Metaphase I und Metaphase II Oozyten erhobene Befunde in einem neuen Licht erscheinen. So ist es nicht möglich, allein aufgrund der negativen Befunde an Oozyten, z.B. nach Applikation von Cadmium (SHIMADA, 1975, 1976; SHIMADA et al., 1977; WATANABE et al., 1977, 1979), Quecksilberverbindungen (JAGIELLO u. LIN,1973), Alkohol (SEITE, 1978) oder Busulfan (BASLER et al., 1979), Aussagen über eine fehlende mutagene Wirkung dieser Substanzen auf weibliche Keimzellen zu machen.

7.7. Stadiensensibilität der Oogenese
- Diaplazentare Mutagenese -

In den bisherigen Versuchen wurde die Testsubstanz adulten Säugern verabreicht, so daß Mutationen im Diktyotän oder in der Prometaphase I der meiotischen Teilung induziert und im Metaphase II Stadium analysiert wurden. In weiteren Untersuchungen sollte nun eine mögliche Sensibilität früher Stadien der Oogenese gegenüber mutagenen Substanzen ermittelt werden. Da bei der Maus sowohl die Entwicklung primordialer Keimzellen, als auch die mitotischen Keimzellteilungen und der Übergang zu Oozyten vom Leptotän bis zum Diktyotän während der Embryonalentwicklung abläuft (s. 2.1.), war es notwendig die Testsubstanz diaplazentar zu verabreichen.

Bereits 1967 wurden erste Untersuchungen zur diaplazentaren Mutagenese von RÖHRBORN und BERRANG begonnen. In diesen Versuchen wurden trächtige Mäuse am 7., 11., 14. oder 15. Tag nach der Konzeption mit Trenimon behandelt. Solchermaßen diaplazentar behandelte Weibchen wurden im Alter von 10 Wochen verpaart. Dominante Letalmutationen fanden sich nur bei den Weibchen, auf die die Testsubstanz am 7. oder 11. Tag ihrer Embryonalentwicklung eingewirkt hatte. Die Unterschiede wurden damit erklärt, daß die Keimzellen bis zum 11. Tag p.c. als primordiale Keimzellen oder Oogonien vorliegen, während sie am 14. und 15. Tag bereits in die erste meiotische Prophase eintreten. Mögliche Gründe für diese Sensibilitätsunterschiede sind noch nicht angegeben. Vergleichbare Resultate wie in den Versuchen mit Trenimon wurden nach transplazentarer Applikation von Trypaflavin erzielt (BASLER et al., 1977a). Wiederum wurden dominante Letalmutationen nur am 7. und 11. Tag der Embryonalentwicklung induziert. Die Häufigkeit induzierter Aberrationen wurde dabei als abhängig von einer stattfindenden DNA-Replikation angesehen. In Anlehnung an die Klassifizierung von BENDER et al. (1974) wurde Trypaflavin den Stoffen zugeordnet, die Chromosomenaberrationen vor allem dann induzieren, wenn Zellen während der G_1 oder frühen S-Phase betroffen wurden. Diese Stadien sind während der Keimzellentwicklung nur in mitotisch sich teilenden Oogonien zu finden, nicht mehr jedoch nach dem Eintreten in das Leptotänstadium der Meiose.

Bei gleichem Versuchsansatz mit Amethopterin hingegen wurden die wenigsten Aberrationen nach Behandlung der Oogonien am 11. Tag p.c. gefunden (HANSMANN, 1974). Diese Resultate wurden als "falsch-negativ" angesehen. Das bedeutet, das Zytostatikum vermag zwar Chromosomenaberrationen zu induzieren, jedoch kommt es zu einer Elimination von Zellen mit Aberrationen im weiteren Verlauf der Mitosezyklen der Oogonienteilungen und sind demzufolge im Metaphase II Stadium nicht mehr erfaßbar.

Dieser Befund steht im Einklang mit den histo-pathologischen Untersuchungen von HILSCHER et al. (1972), der Ratten das Zytostatikum Busulfan an verschiedenen Fetaltagen verabreichte. Wurde die Substanz injiziert, nachdem die Proliferation der Oogonien beendet ist, so blieben in deren Tochterzellen die Oozyten weitgehend intakt. Wurde das Alkylans während des Zeitabschnittes verabfolgt, in der die Oogonien proliferieren, so gehen sie zugrunde. Zum Zeitpunkt der Geburt sind die Keimstränge weitgehend kollabiert und enthalten wenige oder keine Oozyten. Die Ursache der pathologischen Veränderungen sind bisher unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde Mitomycin C eingesetzt, das sich in seinem Wirkmechanismus sowohl von Trenimon als auch von Amethopterin unterscheidet. Wie bereits dargelegt, gehört Mitomycin C zu den Stoffen mit einem "delayed effect". Da es seine mutagene Wirkung erst nach erfolgter DNA-Replikation entfaltet, führt die Applikation von 5 mg/kg während der präovulatorischen Phase nur zu 2,5% Metaphase II Oozyten mit Aberrationen. Da auch zwischen dem Eintreten in das Pachytän und der Ovulation keine mitotischen Teilungen ablaufen, ist somit verständlich, daß sich nur in 3% der Metaphase II Oozyten strukturelle Aberrationen fanden, wenn die Testsubstanz am 17. Tag p.c. injiziert worden war.

Die Befunde in mitotisch sich teilenden Zellen des Knochenmarks und in Zygoten ließen erwarten, daß die Injektion am 11. Tag p.c. zu vielen Aberrationen führen würde. Nach Sektion der Weibchen, bei denen Mitomycin diaplazentar auf die Oogonienteilungen am 11. Tag p.c. einwirken konnte, war es jedoch nicht möglich, Aussagen über eine mutagene Wirkung zu machen.

WIE BUSULFAN BEI RATTEN (HILSCHER ET AL., 1972), WIRKTE MITOMYCIN C AUF DIE KEIMZELLPROLIFERATION SO ZYTOTOXISCH UND MITOSEHEMMEND, DAß NUR DEGENERIERTE KEIMSTRÄNGE ANGELEGT WURDEN, DIE KEINE OOZYTEN ENTHIELTEN.

Aus 275 diaplazentar behandelten Weibchen konnte somit keine einzige Oozyte gewonnen werden. Auch nach Reduktion der injizierten Dosis auf 2,50 und schließlich 1,25 mg/kg änderte sich dieses Bild nicht. Erst die Verminderung auf 0,625 mg/kg wirkte sich nicht so zytotoxisch aus. Es wurden Oozyten angelegt, die allerdings in 4% Chromosomenaberrationen aufwiesen. Als Ursache der zytotoxischen Wirkung von Mitomycin C wurde zunächst vermutet (KERSTEN et al., 1964), daß durch das Zytostatikum DNAase freigesetzt wird. Dies würde mit den Befunden in Einklang stehen (REICH, 1963), daß es zu einem raschen Abbau der DNA in Bakterien und Tumorzellen nach Behandlung mit Mitomycin C kommt. Nicht erklärbar mit dieser Hypothese sind jedoch die in proliferierenden Oogonien und die in nicht replizierenden Oozyten gefundenen unterschiedlichen Resultate. Denkbar ist auch das Absterben der Oogonien in Verbindung zu bringen mit induzierten Crosslinks. Die daraus resultierende Schwierigkeit der Trennung von DNA-Schwestersträngen während der Replikation wäre somit als Grund eines Zelltodes anzusehen (SZYBALSKI u. IYER, 1964). Dieses Konzept der zytotoxischen Wirkung nach Mitomycin C Behandlung kann jedoch nicht als einzige Ursache angesehen werden, wie die vorliegenden Untersuchungen an präimplantativen Embryonen ergaben. Die Alkylierung der DNA erwies sich zwar in Zygoten als stark mutagen, wirkte sich aber im weiteren Verlauf der präimplantativen Entwicklung nur unwesentlich mitosehemmend aus. Obwohl 5 mg Mitomycin C/kg in 43,0% aller Zygoten strukturelle Aberrationen (inklusive Gaps; Tab.12) induzierte und sich hierunter Exchanges und Zellen mit multiplen Aberrationen fanden, waren der überwiegende Teil der Zygoten in der Lage weitere Zellteilungen durchzuführen und das Morula/Blastulastadium zu erreichen. In dieser Versuchsserie (Tab.13) stieg somit der präimplantative Verlust pro Weibchen nur von 1,7 in der Kontrolle auf 2,1 an.

SO BLEIBT ALS HYPOTHESE, DAß ZELLEN MIT ABERRATIONEN WIE BRÜCHE, DELETIONEN UND EXCHANGES ZWAR IN DER LAGE SIND ZELLTEILUNGEN DURCHZUFÜHREN, SICH ALSO VOM ZYGOTENSTADIUM ZU

BLASTOZYSTEN ENTWICKELN KÖNNEN, SICH JEDOCH NICHT IN EINEM GEWEBEVERBAND WIE DEM OVAR ZU DIFFERENZIEREN VERMÖGEN, ZUGRUNDE GEHEN UND SOMIT BEI DER ZYTOGENETISCHEN ANALYSE ZU "FALSCH-NEGATIVEN" RESULTATEN FÜHREN.

7.8. Elimination von chemisch induzierten Chromosomenaberrationen während der Embryogenese

In weiteren Untersuchungen wurden die Auswirkungen der von Mitomycin C in Diktyotän-Oozyten induzierten und in Zygoten zytologisch nachweisbaren Mutationen (Abb.28-I) auf die Embryonalentwicklung hin untersucht (Abb.28 I-III). Hierzu wurden zunächst trächtige Weibchen am 13. oder 16. Tag p.c. seziert und ihr Uterusgehalt auf induzierte dominante Letalmutationen hin untersucht (Tab.14).

Wie bereits im Oozytentest registriert, zeigte sich keine dosisabhängige ovulationshemmende Wirkung des Zytostatikums. Auch war der präimplantative Verlust trotz des hohen Prozentsatzes an Embryonen mit Chromosomenaberrationen (s. Zygotenstadien, Tab.12) gering. Die Häufigkeit präimplantativ abgestorbener Embryonen nach Injektion von 2,5 mg Mitomycin C/kg lag in beiden Versuchsserien im Bereich der Kontrolle. Erst die extrem hohe Dosis von 5 mg/kg (nahezu die LD_{50}) steigerte den präimplantativen Verlust von 0,7/Weibchen in der Kontrollgruppe auf 2,2/Weibchen (Sektion am 13. Tag p.c.) bzw. von 1,2 auf 1,8 (Sektion am 16. Tag p.c.). Eine Erhöhung des präimplantativen Verlusts sollte jedoch nur als möglicher Hinweis auf eine mutagene Wirkung betrachtet werden (RÖHRBORN, 1970b), da exogene Faktoren wie toxische Effekte oder Schädigung der Uteri zum Absterben oder verminderter Implantation führen können.

Kritisch scheint für die Elimination von Embryonen der Zeitraum der Implantation zu sein. Bei einem Teil der toten Implantate handelt es sich um sogenannte Deziduomata im weiteren Sinne, die etwa zum Zeitpunkt der Implantation abgestorben sein dürften.

Auch stieg die Häufigkeit toter Implantate pro Weibchen (früh und spät abgestorbene Implantate) in dosisabhängiger Weise an, bei gleichzeitiger Abnahme der lebenden Embryonen.

Zygoten mit Aberrationen 43,0%	Zygoten ohne Aberrationen 57,0%

I) Zygotenstadium

präim-plantativer Verlust 16,3%	Implantate 83,7%	
	tote Implantate 22,8%	lebende Implantate 60,9%

II) DL-Test 13. Tag p.c.

präim-plantativer Verlust 14,6%	Implantate 85,4%	
	tote Implantate 44,6%	lebende Implantate 40,8%
		ohne Aberrationen 40,4%
		mit 0,4%

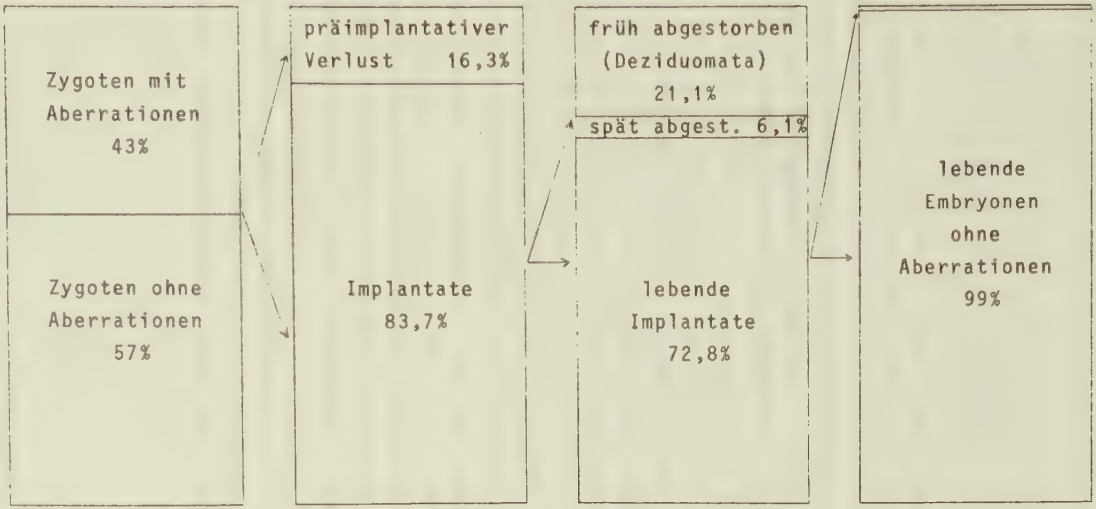
III) DL-Test 16. Tag p.c.

Abb.28: Die Auswirkungen der in Oozyten induzierten Mutationen auf die Embryonalentwicklung. Weiblichen Mäusen wurde 5 mg Mitomycin C/kg unmittelbar vor der Verpaarung intraperitoneal injiziert.
Corpora lutea = 100%

Die Tatsache, daß zum Beispiel 5 mg Mitomycin C/kg in 43,0% der Zygoten Aberrationen entstehen ließ (Abb.28-I), was zu einem präimplantativen Verlust von 16,3% und 22,8% toten Implantaten führte (Abb.28-II), deutete bereits auf eine fast vollständige Elimination von Embryonen mit Mutationen bis zum 13. Tag p.c. hin. So ist erklärlich, daß unter den 13 Tage alten lebenden Implantaten, wie auch unter den 16 Tage alten (Abb.28-III), keine strukturellen Aberrationen mehr auftraten. Auch die Anwendung der Bandentechnik erbrachte keine zusätzliche Information. Trotzdem kam es zwischen dem 13. und 16. Tag p.c. noch zu weiterem Absterben von Embryonen. Während nach Injektion von 5 mg Mitomycin C/kg am 13. Tag p.c. noch 8,1 lebende Implantate pro Weibchen gezählt wurden, sank die Zahl am 16. Tag auf 4,9. Eventuell sind Punktmutationen die Ursache dieser in Spätstadien sich auswirkenden dominanten Letalmutationen. Daneben muß jedoch auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß Zersetzungsprodukte der früh abgestorbenen Implantate zytotoxisch auf die zu diesem Zeitpunkt noch lebenden Embryonen wirkten.

Vergleicht man die Daten der mit den verschiedenen, zu unterschiedlichen Zeiten der Embryonalentwicklung durchgeführten Tests hinsichtlich der Selektion gegen Chromosomenaberrationen, so zeigt sich, daß sie sowohl während der prä- als auch postimplantativen Phase eliminiert werden. Exemplarisch sei dies an der Versuchsserie gezeigt, in der weiblichen Tieren vor der Verpaarung 5 mg Mitomycin C/kg injiziert worden war (Abb.29). Diese Dosis induzierte in Diktyotän-Oozyten Mutationen, die nach erfolgter Replikation in 57,0% der Zygoten Chromosomenaberrationen entstehen ließen (Abb.29-I). Trotz induzierter Aberrationen wie Brüche, Fragmente und Exchanges war der präimplantative Verlust mit 16,3% relativ gering. Die Mehrzahl der Chromosomenaberrationen wirkte sich jedoch bereits kurz nach der Implantation letal aus. Während sich unter den Implantaten 21,1% Deziduomata im weiteren Sinne (d.h. einschließlich früh abgestorbener Implantate; Abb.29-III) fanden, wurden bei der Sektion am 13. Tag p.c. nur 6,1% spät abgestorbene Implantate gezählt. Die lebenden Implantate dieser Serie, wie auch die 16 (Abb.19-IV) und 18 Tage alten, wiesen keine strukturellen Chromosomenaberrationen mehr auf. Allerdings fand sich unter den 16 und 18 Tage alten Embryonen je einer mit einer Monosomie.

Abb.29: Elimination von chemisch induzierten Chromosomenaberrationen während der Embryogenese. Den Muttertieren wurde 5 mg Mitomycin C pro kg unmittelbar vor der Verpaarung mit unbehandelten Männchen intraperitoneal injiziert.



7.9. Das genetische Risiko beim Menschen nach Zytostatikatherapie

Diese tierexperimentellen Untersuchungen lassen die beim Menschen erhobenen Befunde hinsichtlich des genetischen Risikos nach Behandlung mit Zytostatika verständlicher werden. VOGEL und JÄGER (1969) untersuchten in der Bundesrepublik Deutschland 663 Probanden, die in den Jahren 1956 bis 1966 wegen maligner Erkrankungen mit Zytostatika therapiert worden waren, und zwar überwiegend mit den seinerzeit gebräuchlichsten Zytostatika Trenimon (280 behandelte Personen von 663) und Endoxan (79/663). All diese im reproduktionsfähigen Alter befindlichen Patienten wurden befragt hinsichtlich des Vorkommens von Lebend-, Totgeburten und Aborten vor und nach Behandlungsbeginn. Hierbei zeigte sich, daß die Reproduktionsrate der Patienten stark vermindert war, verglichen mit der übrigen Bevölkerung gleichen Alters. Während rein statistisch gesehen 204 Lebendgeburten zu erwarten gewesen wären, wurden nur 6 Kinder geboren und 3 Aborte registriert. Als Gründe wurden Menstruationsstörungen nach Beginn der Therapie angegeben, bei den Männern verminderte Potenta coeundi und als Hauptgrund die schlechte gesundheitliche Verfassung, die einen Teil der Patienten bis zu ihrem Tod ans Krankenbett fesselte.

Nicht zu erwarten war, daß es sich bei den 6 Lebendgeburten um vollständig gesunde Kinder handelte, die auch weiterhin eine normale Entwicklung zeigten. LINKE und FREUDENBERGER (1960) berichteten sogar von einem gesunden Kind, dessen Mutter zunächst mit dem Zytostatikum Bayer E 39 therapiert wurde und dann bis zur 6. Schwangerschaftswoche mit 1 mg Trenimon pro Woche, so daß die Gesamtdosis bis zu diesem Zeitpunkt 10 000 mg Bayer E 39 und 48 mg Trenimon betrug. Schließlich wurden über 50 weitere Fälle von unter Zytostatikatherapie stehenden Frauen beschrieben, die gesunde Kinder gebaren (Zusammenstellung in NISHIMURA u. TANIMURA, 1976).

Wie allerdings tierexperimentelle Untersuchungen gezeigt haben, gehören Zytostatika zu den stärksten chemischen Mutagenen, die sowohl transplazentar Mutationen in Somazellen (BASLER 1979b; BASLER et al., 1979), als auch nach Applikation in der präovulatorischen Phase in Keimzellen zu induzieren ver-

mögen. Desweiteren zeigt die vorliegende Arbeit, daß bereits eine einmalige Injektion einer therapeutischen Dosis zu Mutationen in Diktyotän-Oozyten führt, die in Metaphase II Stadien der Oozyten oder nach erfolgter Replikation in Zygoten zytologisch nachweisbar sind und vererbt werden.

DIE BIOLOGISCHE SELEKTION GEGEN CHROMOSOMENABERRATIONEN, SOWOHL PRÄ- ALS AUCH POSTIMPLANTATIV, FÜHRT JEDOCH ZU EINER FAST VOLLSTÄNDIGEN ELIMINATION WÄHREND DER PRÄNATALEN ENTWICKLUNG.

Somit wird einerseits verständlich, daß das genetische Risiko beim Menschen als relativ gering zu betrachten ist und daß andererseits anhand epidemiologischer Studien oder postnataler Chromosomendiagnostik retrospektiv wenig über Ursachen von Chromosomenaberrationen in Keimzellen ausgesagt werden kann.

Trotz der Selektion ist nach Einwirkung von Zytostatika während der sensiblen präovulatorischen Phase aufgrund eines möglichen Restrisikos eine Pränataldiagnostik in der Frühschwangerschaft indiziert. Schließlich weisen die tierexperimentellen Untersuchungen zur diaplazentaren Mutagenese auf eine beim Menschen bisher zu wenig berücksichtigte Problematik hin. Die einmalige transplazentare Einwirkung von Zytostatika während der Oogonienteilungen ließ äußerlich gesunde Weibchen zur Geburt kommen, die jedoch im adulten Stadium pathologische Veränderungen der Ovarien aufwiesen und somit keine befruchtungsfähigen Oozyten hervorbrachten. Da die Mitte der 60er Jahre geborenen Kinder von unter Zytostatikatherapie stehenden Müttern heute das reproduktionsfähige Alter erreichen, sind Nachuntersuchungen unter Berücksichtigung diese Aspekts anzuregen.

8. Zusammenfassung

1) Eine Methode zur Präparation von Chromosomen im Metaphase I und Methaphase II Stadium aus Oozyten des Syrischen Hamsters (Mesocricetus auratus) wurde entwickelt.

2) Unter Verwendung des Zytostatikums Trenimon wurde die Anwendbarkeit dieser Methode als Mutagenitätstest aufgezeigt.

3) Die zeitliche Obereinstimmung hinsichtlich des meiotischen Verlaufs bei hormonvorbehandelten Syrischen Hamstern und bei Mäusen ermöglicht einen direkten Vergleich der an beiden Spezies erhobenen Mutagenitätsbefunde.

4) Die als Versuchstiere eingesetzten Mäuse des Stammes (101xC3H)F_1 (RÖHRBORN u. HANSMANN, 1971), Chinesischen Hamster (HANSMANN et al., 1974) und Syrischen Hamster weisen keine Unterschiede auf hinsichtlich der Art und Häufigkeit induzierter struktureller Chromosomenaberrationen durch Trenimon. Somit scheint der Syrische Hamster das geeignete Versuchstier zu sein zur Analyse von Metaphasechromosomen aus Oozyten: a) aufgrund des Karyotyps mit den morphologisch voneinander unterscheidbaren Chromosomen, verglichen mit der Maus, b) der Möglichkeit den Östruszyklus zu synchronisieren und eine Superovulation auszulösen, was beim Chinesischen Hamster nicht möglich ist und c) den nur selten auftretenden spontanen Chromosomenaberrationen, im Vergleich sowohl zur Maus als auch zum Chinesischen Hamster.

5) In Zellen des Knochenmarks des Syrischen Hamsters induziert Trenimon strukturelle Chromosomenaberrationen in dosisabhängiger Weise. Verbunden mit dem Reifen und einer Ausschwemmung der Blutzellen, das heißt dem Übergang der Normoblasten, Metamyelozyten und Megakaryozyten vom Knochenmark in die Blutbahn, kommt es jedoch im Knochenmark zu einer raschen Elimination induzierter Aberrationen. Bei einer Aufarbeitung des Knochenmarks eine Woche nach einer einmaligen Applikation von Trenimon liegt die Häufigkeit der Zellen mit Chromosomenaberrationen bereits im Bereich der Kontrolle. Eine chronische Injektion von Chemikalien, die nicht im Körper gespeichert werden, führt demzufolge in Zellen des Knochenmarks zu keiner wesentlichen Steigerung hinsichtlich mutagener Effekte, verglichen mit einer akuten Behandlung.

6) Die einmalige Injektion von Trenimon während der präovulatorischen Phase führte in Oozyten ebenfalls zu strukturellen Chromosomenaberrationen, wie Analysen von Metaphase II Chromosomen ergaben.

7) Da sich die Oozyten des Säugers vom Zeitpunkt der Geburt bis zur Ovulation (= Zeitpunkt der Analyse) in einem Ruhestadium befinden, dem Diktyotän, können induzierte Aberrationen nicht wie in Zellen des proliferierenden Knochenmarks eliminiert werden. In Oozyten des Syrischen Hamsters kam es demzufolge nach chronischer Injektion therapeutischer Dosen von Trenimon zu einer Summation mutagener Effekte. Die Aberrationshäufigkeit nach zehnmaliger Injektion lag somit in Metaphase II Oozyten um ein vielfaches höher als in Zellen des Knochenmarks der gleichen Tiere als auch in Oozyten unbehandelter Tiere.

8) Die Häufigkeit der im Metaphase II Stadium nachweisbaren Aberrationen nach chronischer Injektion war jedoch geringer als aufgrund der theoretischen Oberlegungen zu erwarten war. Die verminderte Zahl auswertbarer Oozyten läßt vermuten, daß ein Teil der geschädigten Oozyten degeneriert, also nicht in die Ovulation eintritt, und somit in Metaphase II Oozyten weniger Aberrationen analysierbar sind als im Diktyotän induziert worden sind.

9) Während in all diesen Untersuchungen strukturelle Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden konnten, fanden sich Hyperploidien weder in der Kontrollserie noch nach Injektion von Trenimon.

10) Statistisch nicht signifikant war auch die Häufigkeit Mitomycin C induzierter Hyperploidien in Oozyten von Mäusen des Stammes NMRI.

11) Zwar wurden durch Injektion von Mitomycin C während der präovulatorischen Phase strukturelle Chromosomenaberrationen induziert, jedoch sind die Effekte als gering zu betrachten im Vergleich zu denen in mitotisch sich teilenden Zellen des Knochenmarks.

12) Untersuchungen an Metaphasechromosomen der ersten postmeiotischen Teilung (Zygotenstadium) ergaben, daß die DNA in

Diktyotän-Oozyten im gleichen Maße alkyliert wird wie die in Zellen des Knochenmarks. Eine replikative DNA Synthese ist jedoch notwendig, um aus den in Oozyten induzierten DNA-Einzelstrangläsionen strukturelle Chromosomenaberrationen werden zu lassen, analysierbar in Zygotenstadien.

13) In weiteren Untersuchungen wurde Mitomycin C diaplazentar zu verschiedenen Zeiten der Embryonalentwicklung verabreicht. F_1 Weibchen, die am 11. Tag der Embryonalentwicklung transplazentar behandelt worden waren, also zum Zeitpunkt ablaufender mitotischer Keimzellteilungen, wiesen im adulten Stadium weitgehend kollabierte Keimstränge auf, die keine oder nur wenige Oozyten enthielten.

14) Die Auswirkungen der in Diktyotän-Oozyten induzierten und nach erfolgter Replikation in Zygoten zytologisch nachweisbaren Mutationen wurden mit Hilfe des Dominant-Letal-Tests (Sektion der Muttertiere am 13. und 16. Tag p.c.), sowie zytologisch anhand embryonaler Leberzellen 13, 16 und 18 Tage alter lebender Implantate untersucht. Beim Vergleich der mit den verschiedenen, zu unterschiedlichen Zeiten der Embryonalentwicklung durchgeführten Tests hinsichtlich der Selektion gegen Chromosomenaberrationen zeigt sich, daß eine Elimination sowohl prä- als auch postimplantativ stattfindet. Als kritisch erwies sich insbesondere der Zeitpunkt kurz nach der Implantation. Bereits am 13. Tag p.c. fanden sich unter den lebenden Embryonen keine strukturellen Chromosomenaberrationen mehr.

15) Diese Untersuchungen zur biologischen Selektion lassen das beim Menschen beschriebene geringe genetische Risiko nach Zytostatikatherapie verständlicher werden. Aufgrund eines potentiellen Restrisikos ist jedoch weiterhin eine Pränataldiagnostik indiziert.

9. Literatur

Adler, I.D.: Cytogenetic effect of Mitomycin C on mouse spermatogonia. Mutat. Res. 21 (1973) 20-21

Adler, I.D.: Comparative cytogenetic study after treatment of mouse spermatogonia with Mitomycin C. Mutat. Res. 23 (1974) 369-379

Adler, I.D.: Aberration induction by Mitomycin C in early primary spermatocytes of mice. Mutat. Res. 35 (1976) 247-256

Adler, I.D., Brewen, J.G., Payne, H.S.: Radiation sensitivity of mouse oocytes. Mutat. Res. 46 (1977) 208

Arora, S.K.: Structural investigations of mode of action of drugs. I. Molecular structure of Mitomycin C. Life Sci. 24 (1979) 1519-1526

Arora, O.P., Shah, V.C., Rao, S.R.V.: Studies on micronuclei induced by Mitomycin-C in the root cells of Vicia faba. Exp. Cell Res. 56 (1969) 443-448

Arrighi, F.E., Hsu, T.C.: Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics 10 (1971) 81-86

Auerbach, C.: Drosophila melanogaster: New mutants. Chemically induced mutations and rearrangements. Dros. Inf. Serv. 17 (1943) 48-50

Auerbach, C., Robson, J.M.: Production of mutations by mustard oil allyl isothiocyanate. Nature 154 (1944) 81

Baker, T.G., Beaumont, H.M., Franchi, L.L.: The uptake of tritiated uridine and phenylalanine by the ovaries of rats and monkeys. J. Cell Sci. 4 (1969) 655-675

Basler, A.: Timing of meiotic stages in oocytes of the Syrian hamster (Mesocricetus auratus) and analysis of induced chromosome aberrations. Hum. Genet. 42 (1978) 67-77

Basler, A.: Timing of the ovulatory phase of the Syrian hamster (Mesocricetus auratus) and analysis of induced chromosomal aberrations. Mutat. Res. 64 (1979a) 102-104

Basler, A.: Sister chromatid exchanges in vivo in Chinese hamster embryonic liver cells exposed transplacentally to BrdU. Cytogenet. Cell Genet. 24 (1979b) 193-196

Basler, A., Röhrborn, G.: Chromosome aberrations in oocytes of NMRI mice and bone marrow cells of Chinese hamsters induced with 3,4-benzpyrene. Mutat. Res. 38 (1976) 327-332

Basler, A., Röhrborn, G.: Mutagenicity of polycyclic hydrocarbons. IV. Correlated studies with anthracene, benz(a)anthracene, benzo(a)pyrene, chrysene and phenanthrene. In: Severi, L. (Ed.): Tumours of early life in man and animals. Division of Cancer Research. Perugia Quadrennial International Conferences on Cancer. Perugia (1978) pp. 843-849

Basler, A., Buselmaier, B., Röhrborn, G.: Elimination of spontaneous and chemically induced chromosome aberrations in mice during early embryogenesis. Hum. Genet. 33 (1976) 121-130

Basler, A., Brucklacher, M., Nobis, F., Röhrborn, G.: Comparative investigations with trypaflavin in metaphase-II oocytes and in dominant lethal assay. Hum. Genet. 40 (1977a) 87-92

Basler, A., Herbold, B., Peter, S., Röhrborn, G.: Mutagenicity of polycyclic hydrocarbons. II. Monitoring genetical hazards of chrysene in vitro and vivo. Mutat. Res. 48 (1977b) 249-254

Basler, A., Theiss, I., Röhrborn, G.: Cytogenetic effects of Busulfan in vivo on bone-marrow cells and oocytes of adult mice and liver cells of transplacentally exposed embryos. Environ. Mutagen. 1 (1979) 233-238

Batra, B.K., Kalra, V.A.: Effects of X-irradiation on mammalian oocytes at specific stages of meiosis. Radiat. Res. 59 (1974) 44-45

Bauer, K.H.: Mutationstheorie der Geschwulstentstehung. Springer, Berlin (1928)

Bautz, E., Freese, E.: On the mutagenic effect of alkylating agents. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 46 (1960) 1585-1594

BAYER-Leverkusen: Zytostatikum Trenimon^{R}. Prospekt D 159/35549 (1972) 1-34

Becker, K., Schöneich, J.: Frequencies of spontaneous meiotic non-disjunction in mouse oocytes. Mutat. Res. 46 (1977) 209-210

Bempong, A.G., Trower, E.C.: Sensitivity of rat testis to inhibitors of nucleic acid synthesis. II. Mutagenic action of Mitomycin C. J. Hered. 64 (1973) 324-328

Bender, M.A., Griggs, H.G., Bedford, J.S.: Mechanisms of chromosomal aberration production. III. Chemicals and ionizing radiation. Mutat. Res. 23 (1974) 197-212

Biggers, J.D., Whitten, W.K., Whittingham, D.G.: The culture of mouse embryos in vitro. In: Danie, J.C. (Ed.): Methods in mammalian embryology. W.H. Freeman, San Fr[illegible]sco (1971) 86-116

Binkert, F., Schmid, W.: Pre-implantation embryos of Chinese hamster. II. Incidence and type of karyotype anomalies after treatment of the paternal post-meiotic germ cells with an alkylating mutagen. Mutat. Res. 46 (1977) 77-86

Blandau, R.J., White, B.J., Rumery, R.E.: Observations on the movements of the living primordial germ cells in the mouse. Fertil. Steril. 14 (1968) 482-489

Borum, K.: Oogenesis in the mouse. Exp. Cell Res. 24 (1961) 495-507

Bourgeois, C.A.: Distribution of Mitomycin C-induced damage in human chromosomes with special reference to regions of repetitive DNA. Chromosoma 48 (1974) 203-211

Brazill, J.L., Masui, Y.: Changing levels of UV light and carcinogen-induced unscheduled DNA synthesis in mouse oocytes during meiotic maturation. Exp. Cell Res. 112 (1978) 121-125

Brewen, J.G., Payne, H.S.: Studies on chemically induced dominant lethality. II. Cytogenetic studies of MMS-induced dominant lethality in maturating dictyate mouse oocytes. Mutat. Res. 37 (1976) 77-82

Brewen, J.G., Payne. H.S.: Studies on chemically induced dominant lethality. III. Cytogenetic analysis of TEM-effects on maturating dictyate mouse oocytes. Mutat. Res. 50 (1978) 85-92

Brewen, J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., Preston, R.J.: Studies on chemically induced dominant lethality. I. The cytogenetic basis of MMS-induced dominant lethality in post-meiotic male germ cells. Mutat. Res. 33 (1975) 239-250

Brewen, J.G., Payne, H.S., Preston, R.J.: X-ray-induced chromosome aberrations in mouse dictyate oocytes. I. Time and dose relationships. Mutat. Res. 35 (1976) 111-120

Brewen, J.G., Payne, H.S., Adler, I.D.: X-ray-induced chromosome aberrations in mouse dictyate oocytes. II. Fractionation and dose rate effects. Genetics 87 (1977) 699-708

Brinster, R.L.: In vitro cultivation of mammalian ova. Advances in the Biosciences 4 (1969) 199-233

Brøgger, A.: Apparently spontaneous chromosome damage in human leukocytes and the nature of chromatid gaps. Hum. Genet. 13 (1971) 1-14

Brøgger, A.: Different patterns of chromosome exchange induced by methyl-methanesulphonate and Mitomycin C in human cells. Hereditas 77 (1974) 205-208

Brøgger, A., Johansen, J.: A model for the production of chromosome damage by Mitomycin C. Chromosoma 38 (1972) 95-104

Brookes, P., Lawley, P.D.: The reaction of mono- and difunctional alkylating agents with nucleic acid. Biochem. J. 80 (1961) 496 - 503

Buselmaier, B., Hansmann, I.: Elimination of induced chromosome aberrations in embryogenesis of mice. Mutat. Res. 29 (1975) 215-216

Caine, A., Lyon, M.F.: The induction of chromosome aberrations in mouse dictyate oocytes by X-rays and chemical mutagens. Mutat. Res. 45 (1977) 325-331

Carr, D.H., Gedeon, M.: Population cytogenetics of human abortuses. In: Hook, E.B., Porter, I.H. (Eds.): Population cytogenetics, studies in humans. Academic Press, New York (1977) pp. 1-9

Challoner, S.: Studies of oogenesis and follicular development in the golden hamster. I. Quantitative study of meiotic prophase in vivo. J. Anat. 117 (1974) 373-383

Chaube, S., Murphy, M.L.: The teratogenic effects of the recent drugs active in cancer chemotherapy. Adv. Teratol. 3 (1968) 181

Chandley, A.C.: Morphological and biochemical aspects of mammalian meiosis. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 18 (1978) 359-365

Chandley, A.C., Speed, R.M.: Testing for nondisjunction in the mouse. Environ. Health Perspect. 31 (1979) 123-129

Chebotar, N.A.: Increase in the rate of spontaneous chromosomal aberrations with age in rats. Genetika 12 (1976a) 158-161

Chebotar, N.A.: The frequencies of spontaneous nondisjunction of chromosomes in metaphase II oocytes from CBA line mice. Tsitologiya 18 (1976b) 897-899

Chebotar, N.A.: Age related increase in the frequency of spontaneous karyotype aberrations in mice. Genetika 14 (1978) 551-553

Chiquoine, A.D.: The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. Anat. Res. 118 (1954) 135-146

Chouinard, L.A.: A light- and electron-microscope study of nucleolus during growth of the oocyte in the prepubertal mouse. J. Cell Sci. 9 (1971) 637-663

Chouinard, L.A.: An electron-microscope study of the extranucleolar bodies during growth of the oocyte in the prepubertal mouse. J. Cell Sci. 12 (1973) 55-69

Cohen, M.M., Shaw, M.W.: Effects of Mitomycin C on human chromosomes. J. Cell Biol. 23 (1964) 386-395

Comings, D.E.: Implications of somatic recombination and sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome and cells treated with Mitomycin C. Hum. Genet. 28 (1975) 191-196

Crone, M., Levy, E., Peters, H.: The duration of the premeiotic DNA synthesis in mouse oocytes. Exp. Cell Res. 39 (1965) 678-688

Datta, P.K., Frigger, H., Schleiermacher, E.: The effect of chemical mutagens on the mitotic chromosomes of the mouse, in vivo. In: Vogel, F., Röhrborn, G. (Eds.): Chemical mutagenesis in mammals and man. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1970) pp. 194-213

DHEW (NIOSH) Publ. No. 79-100. Lewis, R.J., Tatken, R.L. (Eds.): Registry of toxic effects of chemical substances. Cincinnati, (1979)

Donahue, R.P.: Fertilization of the mouse oocyte: sequence and timing of nuclear progression to the two-cell stage. J. Exp. Zool. 180 (1972a) 305-318

Donahue, R.P.: Cytogenetic analysis of the first cleavage division in mouse embryos. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 (1972b) 74-77

Donahue, R.P.: Chromosomal anomalies and the meiotic divisions of the oocyte. In: Shepard, H., Miller, J.R., Marois, M. (Eds.): Methods for detection of environmental agents that produce congenital defects. North-Holland Publishing, Amsterdam-Oxford (1975) pp. 125-139

Donahue, R.P., Karp, L.E.: Chromosomal anomalies after fertilization of aged, post-ovulatory mouse oocytes. Am. J. Hum. Genet. 25 (1973) 24A

Dŷcka, J. Biometrische Auswertung. In: Ehling, U.H. (Ed.): Methodik der Mutagenitätsprüfung III. Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, GSF-Bericht B 630 (1976) 46-74

Edwards, R.G.: Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals. Nature 196 (1962) 446-450

Edwards, R.G., Gates, A.H.: Timing of the stages of the maturation divisions, ovulation, fertilization and the first cleavage of eggs of adult mice treated with gonadotropins. J. Endocrinol. 18 (1959) 292-304

Ehling, U.H.: Comparison of radiation- and chemically-induced dominant lethal mutations in mals mice. Mutat. Res. 11 (1971) 35-44

Ehling, U.H., Cumming, R.B., Malling, H.V.: Induction of dominant lethal mutations by alkylating agents in male mice. Mutat. Res. 5 (1968) 417-428

Elmore, D.T., Gulland, J.M., Jordan, D.O., Taylor, H.F.W.: The reaction of nucleic acids with mustard gas. Biochem. J. 42 (1948) 308-316

Epstein, S.S., Arnold, E., Andrea, J., Bass, W., Bishop, Y.: Detection of chemical mutagens by the dominant lethal assay in the mouse. Toxicol. Appl. Pharmacol. 23 (1972) 288-325

Evans, H.J.: Chromosome aberrations induced by ionizing radiations. Int. Rev. Cytol. 13 (1962) 221-321

Evans, H.J.: Possible reasons for variation in chromosome radiosensitivity during mitotic and meiotic cycles. In: Sobels, F. (Ed.): Repair from genetic radiation damage. Pergamon Press Oxford (1963a) pp. 31-49

Evans, H.J.: Chromosome aberrations and the target theory. In: Wolff, S. (Ed.): Radiation induced chromosome aberration. Columbia Univ. Press. New York (1963b) pp. 8-40

Evans, E.P., Breckon, G., Ford, C.E.: An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. Cytogenetics 3 (1964) 289-294

Fowler, R.G., Edwards, R.G.: Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotropins. J. Endocrinol. 15 (1957) 374-384

Fraser, L.R., Maudlin, I.: Analysis of aneuploidy in first-cleavage mouse embryos fertilized in vitro and in vivo. Exp. Health Perspect. 31 (1979) 141-149

Freese, E.: Molecular mechanisms of mutations. In: Hollaender, A. (Ed.): Chemical mutagens, Principles and methods for their detection. Vol.1. Plenum Press, New York-London (1971) pp. 1-56

Funes-Cravioto, F., Yakovienko, K.N., Kuleshov, N.P., Zurkov, V.S.: Localization of chemically induced breaks in chromosomes of human leukocytes. Mutat. Res. 23 (1974) 87-105

Gauss, W.: Ober die Umsetzung einiger Alkox$_{y}$-p-benzochinone mit Äthylenimin. Chem. Ber. 91 (1958) 2216-2222

Gauss, W., Petersen, S.: Weitere Untersuchungen an Äthyleniminochinonen. Angew. Chem. 70 (1958) 703

Gauss, W., Petersen, S.: Entwicklung und Synthese therapeutisch wertvoller Äthylenimino-chinone. Medizin und Chemie 7 (1963) 649-665

Gebhart, E.: Experimentelle Beiträge zum Problem der lokalen Achromasien (Gaps). Hum. Genet. 13 (1971) 98-107

Gebhart, E., Bauer, D.: Inter- und intrachromosomale Verteilung von Chromatidtranslokationen nach Einwirkung von Trenimon auf menschliche Leukocyten in vitro. Chromosoma 32 (1970) 152-161

Generoso, W.M.: Evaluation of chromosome aberration effects of chemicals on mouse germ cells. Environ. Health Perspect. 6 (1973) 13-22

Generoso, W.M., Huff, S.W., Stout, S.K.: Chemically induced dominant-lethal mutations and cell killing in mouse oocytes in the advanced stages of follicular development. Mutat. Res. 11 (1971) 411-420

German, J.: Cytological evidence for crossing-over in vitro in human lymphoid cells. Science 144 (1964) 298-301

German, J., La Rock, J.: Chromosomal effects of Mitomycin, a potential recombinogen in mammalian cell genetics. Tex. Rep. Biol. Med. 27 (1969) 409-418

Gilliavod, N., Lēonard, A.: Tests for mutagenic effects of chemicals in mice. I. Effects of Mitomycin C on spermatogonia. Mutat. Res. 13 (1971) 274-275

Gilliavod, N., Lēonard, A.: Sensitivity of the mouse oocytes to the induction of translocations by ionizing radiations. Can. J. Genet. Cytol. 15 (1973) 363-366

Gilliavod, N., Lēonard, A.: Dose-relationship for translocations induced by X-irradiation in mouse oocytes. Mutat. Res. 25 (1974) 425-426

Gosden, R.G., Walters, D.E.: Effects of low-dose X-irradiation on chromosomal non-disjunction in aged mice. Nature 248 (1974) 54-55

Graves, A.P.: Development of the golden hamster, Cricetus auratus Waterhouse, during the first nine days. Am. J. Anat. 77 (1945) 219-251

Greenwald, G.S., Peppler, R.D.: Prepubertal and pubertal changes in the hamster ovary. Anat. Rec. (1968) 447-458

Hampel, K.E.: Ober die Wirkung von Zytostatika auf die Chromosomen des Menschen. Int. J. Clin. Pharmacol. 1 (1968) 322-371

Hampel, K.E., Stopik, D.: Intrachromosomal distribution of spontaneous and induced breaks in human lymphocytes. Acta Haematol. 46 (1971) 136-141

Hampel, K.E., Kober, B., Rösch, D., Gerhartz, H., Meinig, K.-H.: The action of cytostatic agents on the chromosomes of human leukocytes in vitro. Blood 27 (1966) 816-823

Hansmann, I.: Induced chromosomal aberrations in pronuclei, 2-cell stages and morulae of mice. Mutat. Res. 20 (1973) 353-367

Hansmann, I.: Chromosome aberrations in metaphase II-oocytes stage sensitivity in mouse oogenesis to amethopterin and cyclophosphamide. Mutat. Res. 22 (1974) 175-191

Hansmann, I.: The induction of non-disjunction in mammalian oogenesis. In: Evans u. Lloyd (Eds.): Mutagen-induced chromosome damage in man. Edinburgh University Press, Edinburgh (1978) pp. 315-321

Hansmann, I., El-Nahass, E.: Incidence of nondisjunction in mouse oocytes. Cytogenet. Cell Genet. 24 (1979) 115-121

Hansmann, I., Probeck, H.D.: Chromosomal imbalance in ovulated oocytes from Syrian hamsters (Mesocricetus auratus)

and Chinese hamsters (Cricetulus griseus). Cytogenet. Cell Genet. 23 (1979a) 70-76

Hansmann, J., Probeck, H.D.: The induction of non-disjunction by irradiation in mammalian oogenesis and spermatogenesis. Mutat. Res. 61 (1979b) 69-76

Hansmann, I., Röhrborn,G.: Chromosome aberrations in preimplanation stages of mice after treatment with triazoquinone. Human. Genet. 18 (1973a) 101-109

Hansmann,I., Röhrborn, G.: Stage sensitivity in the oogenesis of mice (Abstr.) Mutat. Res. 21 (1973b) 35

Hansmann, I., Neher, J., Röhrborn, G.: Chromosome aberrations in metaphase II oocytes of Chinese hamster (Cricetulus griseus). I. The sensitivity of the pre-ovulatory phase to triaziquone. Mutat. Res. 25 (1974) 347-359

Hansmann, I., Röhrborn, G., Neher, J.: Chromosome aberrations in metaphase II oocytes of Chinese hamsters (Cricetulus griseus) Mutat. Res. 29 (1975 a) 218-219

Hansmann, I., Reichert, W., Röhrborn, G.: X-ray-induced chromosome aberrations in oocytes of mice. II. Sensitive stages in the oogenesis. Mutat. Res. 29 (1975b) 218

Hata, T., Sano,Y., Sugawara, R., Matsumae, A., Kanamori, K., Shima, T., Hoshi, T.: Mitomycin, a new antibiotic from Streptomyces. J. Antibiot. Ser. A 9 (1956) 141-146

Henderson, S.A., Edwards, R.G.: Chiasma frequency and maternal age in mammals. Nature 217, (1968) 22-28

Hilscher, W., Hilscher, B., Gauss,G., Lippers,P., Bülthoff, B.: Untersuchung zur Kinetik der Gonocyten und Stützzellen der Wistarratte unter normalen und pathologischen Bedingungen. Andrologie 4 (1972) 311-325

Hilscher, B., Hilscher, W., Bülthoff-Ohnolz, B., Krämer, U., Birke, A., Pelzer, H., Gauss, G.: Kinetics of gametogenesis. Cell Tiss. Res. 154 (1974) 443-470

Hoehn, H., Martin, G.M.: Heritable alteration of human constitutive heterochromatin induced by Mitomycin C. Exp. Cell Res. 75 (1972) 275-278

Hoehn, H., Martin, G.M.: Clonal variants of constitutive heterochromatin of human fibroblasts after recovery from Mitomycin treatment. Chromosoma 43 (1973) 203-210

Iyer, V.N., Szybalski, B.: A molecular mechanism of Mitomycin action : Linking of complementary DNA strands. Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1963) 355-362

Jacobs, P.A.: Chromosome mutations: Frequency at birth in humans. Hum. Genet. 16 (1972) 137-140

Jagiello, G.M.: A method for meiotic preparations of mammalian ova. Cytogenetics 4 (1965) 245-250

Jagiello, G.M.: Streptonigrin: Effect on the first meiotic metaphase of the mouse egg. Science 157 (1967) 453-454

Jagiello, G.M.: Action of phleomycin on the meiosis of the mouse ovum. Mutat. Res. 6 (1968) 289-295

Jagiello, G.M.: Meiosis and inhibition of ovulation in mouse eggs treated with actinomycin D. J. Cell Biol. 42 (1969) 571-574

Jagiello, G.M., Lin, J.S.: An assessment of the effects of mercury on the meiosis of mouse ova. Mutat. Res. 17 (1973) 93-99

Jagiello, G.M., Lin, J.S.: Oral contraceptive compounds and mammalian oocyte meiosis. Am. J. Obstet. Gynecol. 120 (1974) 390-406

Jagiello, G.M., Ducayen, M.B., Lin, J.S.: A meiotic cytogenetic study in mice of a commonly used tranquilizer reported to concentrate in mammalian follicular fluid. Teratology 7 (1973) 17-22

Jagiello, G.M., Miller, W.A., Ducayen, M.B., Lin, J.S.: Chiasma frequency and disjunctional behavior of ewe and cow oocytes matured in vitro. Biol. Reprod. 10 (1974) 354-363

Jagiello, G.M., Lin, J.S., Ducayen, M.B.: SO_2 and its metabolite: Effects on mammalian egg chromosomes. Environ. Res. 9 (1975) 84-93

Jeon, K.W., Kennedy, J.R.: The primordial germ cells in early mouse embryos: Light and electron microscopic studies. Dev. Biol. 31 (1973) 275-284

Jones, K.W.: Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. Nature, 225 (1970) 912-915

Kaufmann, W., Gebhart, E., Horbach, L.: Determination of the threshold value of the mutagenic activity of Trenimon on human lymphocytes "in vitro". Hum. Genet. 20 (1973) 1-8

Kersten, H., Kersten, W., Leopold, G., Schnieders, B.: Effect of Mitomycin C on DNAase and RNA in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 80 (1964) 521-523

Khan, A.H., Ross, W.C.J.: Tumour-growth inhibitory nitrophenylaziridines and related compounds: Structure-activity relationships. Chem. Biol. Interact. 1 (1969) 27-47

Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. (Eds.): Handbook of mutagenicity test procedures. Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1977)

Kirsch, E.J.: Mitomycin.In: Gottlieb, D., Shaw, P.D. (Eds.) Antibiotics II-Biosynthesis. Springer-Verlag, New York, (1967) pp. 66-76

Kobayashi,J.: The cytological effect of chemicals on tumors. X. On the effect of Mitomycin C on tumor cells of two animal tumors. Cytologia 25 (1960) 280-288

Kuhlmann, W.: Cytology and timing of meiotic stages in female germ cells of mammals and man. In: Vogel, F., Röhrborn, G. (Eds.): Chemical mutagenesis in mammals and man. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1970) pp. 180-193

Lavappa, K.S., Yerganian, G.: Effects of Mitomycin C on chromosomes of bone marrow cells of the Chinese hamster. Genetics, 71 (1972) 32-33

Leblond, C.P., Clermont, Y.: Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by PAFSA technique. Amer. J. Anat. 90 (1952a) 167-206

Leblond, C.P., Clermont, Y.: Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in rat. Ann. NY. Acad. Sci. 55 (1952b) 548-573

Lehman , J.M., Macpherson, J., Moorhead, P.S.: Karyotype of the Syrian hamster. J. Natl. Cancer Inst. 31 (1963) 639-650

Lemon, J.G., Morton, W.R.M.: Oogenesis in the golden hamster (Mesocricetus auratus). A study of the first meiotic prophase. Cytogenetics 7 (1968) 376-389

Leonard, A.: Observations of mouse dividing spermatocytes for chromosomal aberrations induced in spermatogonia by chemical mutagens. Mutat. Res. 21 (1973) 39

Leonard, A.: Heritable chromosome aberrations in mammals after exposure to chemicals. Radiat. Environ. Biophys. 13 (1976) 1-8

Leonard, A., Linden, G.: Obersvation of dividing spermatocytes for chromosome aberrations in mouse spermatogonia by chemical mutagens. Mutat. Res. 16 (1972) 297-300

Lima-De-Faria, A., Borum, K.: The period of DNA synthesis prior to meiosis in the mouse. J. Cell Biol. 14 (1962) 381-388

Lindemann, H., Harbers, E.: In-vitro-Reaktion der drei alkylierenden Pharmaka Cyclophosphamid, Ifosfamid und Trofosfamid mit DNS und DNS-Bausteinen. Drug Res. 30 (1980) 2075-2080

Linford, J.H.: 2,3,5-Tris-ethylenimino-1,4-benzoquinone (Trenimon): Some chemical and biological properties. Chem.-Biol. Interact. 6 (1973) 149-168

Linke, A., Freudenberger, B.: Ober die Chemotherapie der Hämoblastosen und malignen Tumoren. In: Meythaler, F. (Ed.): Chemotherapeutische Probleme maligner Tumoren. Zweite Folge. Ferdinand Enke, Stuttgart (1960) pp.38-134

Lown, J.W.: The molecular mechanism of antitumor action of the Mitomycins. In: Carter, S.K., Crooke, S.T. (Eds.): Mitomycin C. Academic Press, New York (1979) pp. 5-26

Lown, J.W., Begleiter, A., Johnson, D., Morgan, A.R.: Studies related to antitumor antibiotics. Part V. Reaction of Mitomycin C with DNA examined by ethidium fluorescence assay. Can. J. Biochem. 54 (1976) 110-119

Lüers, H., Röhrborn, G.: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. III. Äthylenimine. Mutat. Res. 2 (1965) 29-44

Luthardt, F.W., Palmer, C.G., Yu, P.L.: Chiasma and univalent frequencies in aging female mice. Cytogenet. Cell Genet. 12 (1973) 68-79

Mann, H.B., Withney, D.R.: On a test whether one of two random variables is stochastically larger than the other. Ann. Math. Statist. 18 (1947) 50-60

Manyak, A., Schleiermacher, E.: Action of Mitomycin C on mouse spermatogonia. Mutat. Res. 19 (1973) 99-108

Marinone, G., Venturelli, R.: Il danno cromosomico da antimitotici. Problemi generali e osservazioni cliniche. Friuli Medico Udine 25 (1970) 85-119

Martin, R.H., Dill, F.J., Miller, J.R.: Nondisjunction in aging female mice. Cytogenet. Cell Genet. 17 (1976) 150-160

Masui, Y., Pedersen, R.A.: Ultraviolet light-induced unscheduled DNA synthesis in mouse oocytes during meiotic maturation. Nature 257 (1975) 705-706

Matsuura, H., Tanifuji, S., Saho, T., Iwabuchi, M.: Effect of Mitomycin-C on the frequency of chromosome aberrations produced by X-rays. Am. Nat. 97 (1963) 191-193

Matter, B.E.: Failure to detect chromosome damage in bone-marrow cells of mice and Chinese hamsters exposed in vivo to some ergot derivatives. J. Int. Med. Res. 4 (1976) 382-392

McGaughey, R.W., Chang, M.C.: Chromosomes at prometaphase and metaphase of the first cleavage in mouse and hamster eggs. J. Exp. Zool. 177 (1971) 31-40

Merz, T.: Effect of Mitomycin C on lateral root tip chromosomes of Vicia faba. Science 133 (1961) 329-330

Midgley, A.R., Pierce, B., Dixon, F.J.: Nature of colchicine resistance in golden hamster. Science 130 (1959) 40-41

Mintz, B.: Embryological phases of mammalian gametogenesis. J. Cell Comp. Pysiol. 56 Suppl. 1 (1960) 31-48

Morad, M., Jonasson, J., Lindsten, J.: Distribution of Mitomycin C induced breaks on human chromosomes. Hereditas 74 (1973) 273-282

Muller, H.J.: Artificial transmutation of the gene. Science 66 (1927) 84-87

Nakano, A.: Histological studies of the prenatal and postnatal development of the ovary in the golden hamster (Cricetus auratus). Okajimas Folia Anat. Jpn. 35 (1960) 183-217

Natarajan, A.T., Ahnström, G.: Heterochromatin and chromosome aberrations. Chromosoma 28 (1969) 48-61

Natarajan, A.T., Raposa, T.: Heterochromatin and chromosome aberrations. A comparative study of three mouse cell lines with different karyotype and heterochromatin distribution. Hereditas 80 (1975) 83-90

Natarajan, A.T., Schmid, W.: Differential response of constitutive and facultative heterochromatin in the manifestation of Mitomycin induced chromosome aberrations in Chinese hamster cells in vitro. Chromosoma 33 (1971) 48-62

Natarajan, A.T., Upadhya, M.D.: Localized chromosome breakage induced by ethyl methanesulfonate and hydroxylamine in Vicia faba. Chromosoma 15 (1964) 156-159

Nemenyi, P.: Distribution free multiple comparisons. State University, Downstate Medical Center, New York (1963)

Nicoloff, H.R., Gecheff, K.: Localized breakage by 2,3,5-tris-ethyleneimino-1,4-benzoquinone in barley chromosomes. Mutat. Res. 6 (1968) 257-261

Nicoloff, H.R., Rieger, R., Künzel, G. Michaelis, A.: Non-random intrachromosomal distribution of chromatid aberrations induced by alkylating agents in barley. Mutat. Res. 30 (1975) 149-152

Nishimura, H., Tanimura, T.: Clinical aspects of the teratogenicity of drugs. Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford (1976)

Nowell, P.C.: Mitotic inhibition and chromosome damage by Mitomycin in human leukocyte cultures. Exp. Cell Res. 33 (1964) 445-449

Oakberg, E.F.: Relationship between stage of follicular development and RNA synthesis in the mouse oocyte. Mutat. Res. 6 (1968) 155-165

Obe, G.: The action of ethyleneimines on the chromosomes of Vicia faba. Mutat. Res. 13 (1971) 421-424

Obe, G., Beek, B.: Trenimon: biochemical, physiological and genetic effects on cells and organisms. Mutat. Res. 65 (1979) 21-70

Oehlkers, F.: Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien. Z. ind. Abst. Vererbgl. 81 (1943) 313-341

Ogawa, K., Nomura, A., Fujiwara, T., Tomita, K.: Crystal and molecular structure of Mitomycin C, an anticancer antibiotic. Bull. Chem. Soc. Jpn. 52 (1979)2334-2338

Ohno, S., Smith, J.B.: Role of fetal follicular cells in meiosis of mammalian oöcytes . Cytogenetics 3 (1964) 324-333

Ohno, S., Kaplan, W.D., Kinosita, R.:X-chromosome behavior in germ and somatic cells of rattus norvegicus. Exp. Cell Res. 22 (1961) 535-544

Orsini, M.W., Pansky,B.: The natural resistance of the golden hamster to colchicine. Science 115 (1952) 88-89

Payne, H.S., Jones, K.P.: Technique for mass isolation and culture of mouse ova for cytogenetic analysis of the first cleavage mitosis. Mutat. Res. 33 (1975) 247-249

Pedersen, T., Mangia, F.: Ultraviolet-light-induced unscheduled DNA synthesis by resting and growing mouse oocytes. Mutat. Res. 49 (1978) 425-429

Peters, H., Levy E.: Cell dynamics of the ovarian cycle. J. Reprod. Fert. 11 (1966) 227-236

Peters, H., Levy, E., Crone, M.: Deoxyribonucleic acid synthesis in oocytes of mouse embryos. Nature 195 (1962) 915-916

Peters, H., Levy, E., Crone, M.: Oogenesis in rabbits. J. Exp. Zool. 158 (1965) 169-179

Polani, P.E., Jagiello, G.M.: Chiasmata, meiotic univalents, and age in relation to aneuploid imbalance in mice. Cytogenet. Cell Genet. 16 (1976) 505- 529

Rao, R.N., Natarajan, A.T.: Somatic association in relation to chemically induced chromosome aberrations in Vicia faba. Genetics 57 (1967) 821-835

Reich, E.: Biochemistry of actinomycins . Cancer Res. 23 (1963) 1428-1441

Reichert, W., Hansmann, I., Röhrborn, G.: X-ray-induced chromosome aberrations in oocytes of mice. I. Dose-dependent chromosome aberrations in ovulated oocytes after irradiation of the pre-ovulatory phase. Mutat. Res. 29 (1975a) 217

Reichert, W., Hansmann, I., Röhrborn, G.: Chromosome anomalies in mouse oocytes after irradiation. Hum. Genet. 28 (1975b) 25-38

Renier, B., Zamenhof, S.: Studies on the chemically reactive groups of deoxyribonucleic acids. J. Biol. Chem. 228 (1957) 475-486

Rieger, R., Michaelis, A.: Chromosomenmutationen. Gustav Fischer Verlag, Jena (1967)

Rieger, R., Michaelis, A., Schubert, I., Meister, A.: Somatic interphase pairing of Vicia chromosomes as inferred from the hom/het ratio of induced chromatid interchanges. Mutat. Res. 20 (1973) 295-298

Rieger, R., Michaelis, A., Schubert, I., Döbel, P., Jank, H.W.: Non-random intrachromosomal distribution of chromatid aberrations induced by X-rays, alkylating agents and ethanol in Vicia faba. Mutat. Res. 27 (1975) 69-79

Roberts, J.J.: Repair of alkylated DNA in mammalian cells. In: Hanawalt, C.P., Setlow, R.B. (Eds.): Molecular mechanisms for repair of DNA. Basis Life Sciences Ser. Vol. 5B, Plenum Press, New York-London (1975) pp. 611-616

Rodman, T.C.: Chromosomes of the first polar body in mammalian meiosis. Exp. Cell Res. 68 (1971a) 205-210

Rodman, T.C.: Chromatid disjunction in unfertilized ageing oocytes. Nature 233 (1971b) 191-193

Rodman, T.C., Biedler, J.L.: Specifity of compaction in meiotic chromosomes of the female Chinese hamster. Chromosoma 42 (1973) 229-246

Röhrborn, G.: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. Klassifizierungsversuch chemischer Mutagene. Experientia 16 (1960) 523-529

Röhrborn, G.: Biochemical mechanisms of mutation. In: Vogel, F., Röhrborn, G. (Eds.): Chemical mutagenesis in mammals and man. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1970a) pp. 1-15

Röhrborn, G.: The dominant lethals: Method and cytogenetic examination of early cleavage stages. In: Vogel, F., Röhrborn, G. (Eds.): Chemical mutagenesis in mammals and man. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1970b) pp. 148-155

Röhrborn, G.: The activity of alkylating agents. In: Vogel, F., Röhrborn, G. (Eds.): Chemical mutagenesis in mammals and man. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1970c) pp. 294-316

Röhrborn, G.: Frequencies of spontaneous non-disjunction in metaphase II oocytes of mice. Hum. Genet. 16 (1972) 123-125

Röhrborn, G.: Experimentelle Untersuchungen zur Altersabhängigkeit des spontanen Nondisjunction-Prozesses bei der Maus. In: Schaefer,U. (Ed.) Verhandlungen der Gesellschaft für Anthropologie und Humangenetik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1975) pp. 239-241

Röhrborn,G., Basler, A.: Genetic aspects of dose-effect-relationships and their significance for the extrapolation to man - Chromosome aberrations. Abhand. Akad. Wiss. DDR, N9 (1977a) 101-111

Röhrborn, G., Basler, A.: Cytogenetic investigations of mammals. Comparison of the genetic activity of cytostatics in mammals. Arch. Toxicol. 38 (1977b) 35-43

Röhrborn, G., Berrang, H.: Dominant lethals in young female mice. Mutat. Res. 4 (1967) 231-233

Röhrborn, G., Hansmann, I.: Induced chromosome aberrations in unfertilized oocytes of mice. Hum. Genet. 13 (1971) 184-198

Röhrborn, G., Hansmann,I.: Chromosomal aberrations in the early embryogenesis of mice. Mutat. Res. 21 (1973) 46

Röhrborn, G., Hansmann, I.: Oral contraceptives and chromosome segregation in oocytes of mice. Mutat. Res. 26 (1974) 535-544

Röhrborn, G., Kühn, O., Hansmann, I., Thon, K.: Induced chromosome aberrations in early embryogenesis of mice. Hum. Genet. 11 (1971) 316-322

Röhrborn, G., Hansmann, I., Buckel, U.: Cytogenetic analysis of pre- and postovulatory oocytes and pre-implantation embryos in mutagenesis of mammals. In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. (Eds.) Handbook of mutagenicity test procedures. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam (1977) pp. 301-310

Röhrborn, G., Sezer, V., Adler, I.D., Schmaltz, A., Pawlowitzki, I.H., Nautsch, Ch.: Effects of Isoniazid on the oogenesis of mice. Hum. Genet. 42 (1978) 55-58

Ross, W.C.J.: The chemistry of cytotoxic alkylating agents. Adv. Cancer Res. 1 (1953) 397-449

Ross, W.C.J.: In vitro reactions of biological alkylating agents. Ann. NY Acad. Sci. 68 (1958) 669-681

Ross, W.C.J.: Biological alkylating agents. Butterwoths, London (1962)

Runner, M.N., Palm, J.: Transplantation and survival of unfertilized ova of the mouse in relation to postovulatory age. J. Exp. Zool. 124 (1953) 303-316

Russell, L.B.: Meiotic nondisjunction in the mouse: methodology for genetic testing and comparison with other methods. Environ. Health Perspect. 31 (1979) 113-128

Sankaranarayanan, K.: The role of non-disjunction in aneuploidy in man. Mutat. Res. 61 (1979) 1-28

Sax, K.: Chromosome aberrations induced by X-rays. Genetics 23 (1938) 494-516

Sax, K.: An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in Tradescantia. Genetics 25 (1940) 41-68

Scheid, W., Traut, H.: Ultraviolet-microscopical studies on achromatic lesions (gaps) induced in the chromosomes in Vicia faba. Mutat. Res. 10 (1971a) 159-161

Scheid, W., Traut, H.: Visualization by scanning electron microscopy of achromatic lesions ("gaps") induced by X-rays in chromosomes of Vicia faba. Mutat. Res. 11 (1971b) 253-255

Schleiermacher, E.: Über den Einfluß von Trenimon und Endoxan auf die Meiose der männlichen Maus. Hum. Genet. 3 (1966a) 127-133

Schleiermacher, E.: Über den Einfluß von Trenimon und Endoxan auf die Meiose der männlichen Maus. Hum. Genet. 3 (1966b) 134-155

Schleiermacher, E.: Chemical mutagenesis in mammals and man, 2. Cytogenetic effects of radiomimetic drugs on the meiosis in the male mouse. Jap. J. Genet. 44, Suppl. 2 (1969) 80-81

Schleiermacher, E.: The activity of alkylating agents, II. Histological and cytogenetic findings in spermatogenesis In: Vogel, F., Röhrborn, G.(Eds.): Chemical Mutagenesis in Mammals and Man. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New York (1970)

Schleiermacher, E.: Effects of chemical mutagens on spermatogonia of mammals. I. Action of Mitomycin C on mouse spermatogonia. Mutat. Res. 21 (1973) 47-48

Schmid, W.: DNA replication patterns of human chromosomes. Cytogenetics 2 (1963) 175-193

Schmid, W., Binkert, F.: Cytogenetic studies in preimplantation embryos of Chinese hamsters. Results of controls and after treatment of fathers with alkylating agent. Mutat. Res. 21 (1973) 233-234

Schmid, W., Staiger, G.R.: Chromosome studies on bone marrow from Chinese hamsters treated with benzodiazepine tranquillizers and cyclophosphamide. Mutat. Res. 7 (1969) 99-108

Schmid, W., Arakaki, D.T., Breslau, N.A., Culbertson, J.C.: Chemical mutagenesis, The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system, I. Cytogenetic results on basic aspects of the methodology, obtained with alkylating agents. Hum. Genet. 11 (1971) 103-118

Schwartz, H.S., Sodergren, J.E., Philips, F.S.: Mitomycin C: chemical and biological studies on alkylation. Science 142 (1963) 1181-1183

Searle, A.G., Beechey, C.V.: Cytogenetic effects of X-rays and fission neutrons in female mice. Mutat. Res. 24 (1974) 171-186

Seite, W.: Die Wirkung chronischer Äthanolgabe auf die Oogenese der Maus. Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf (1978)

Shah, V.C.: Effects of some antibiotics on cell cycles of cultured and meristematic cells. In: Talwar, G.P. (Ed.): Regulation of growth and differentiated function in eucaryote cells. Raven Press. New York (1975) pp. 41-55

Shah, V.C., Rao, S.R., Arora, O.P.: Effect of Mitomycin C on root meristem cells of Vicia faba L. Indian J. Exp. Biol. 10 (1972) 431-435

Shaver, E.L.: Pentobarbital sodium and chromosome abnormalities in rabbit blastocysts. Experentia 31 (1975) 1212-1213

Shaw, M.W., Cohen, M.M.: Chromosome exchanges in human leukocytes induced by Mitomycin C. Genetics, 51 (1965) 181-190

Shiba, S., Terawaki, A., Taguchi, T., Kamawata, J.: Selective inhibition of formation of deoxyribonucleic acid in Escherichia coli by Mitomycin C. Nature 183 (1959) 1056-1057

Shimada, T., Watanabe, T., Endo, A.: Chromosome analysis in metaphase II oocytes for the detection of mutagenicity of cadmium in mice. Teratology 12 (1975) 210

Shimada, T., Watanabe, T., Endo, A.: Potential Mutagenicity of cadmium in mammalian oocytes. Mutat. Res. 40 (1976) 389-396

Shimada, T., Watanabe, T., Endo, A.: Cadmium-induced chromosomal mutation in hamster oocytes and zinc metabolism. Teratology 16 (1977) 121

Shotton, D., Monie, I.W.: Possible teratogenic effect of chlorambucil on a human fetus. J. Amer. Med. Ass. (1963) 74-75

Sinkus, A.H.: Chromosomal damage in cultured human lymphocytes taken from patients after rubomycin C treatment. Genetika 14 (1972) 1184-1187

Sirlin, J.L., Edwards, R.G.: Timing of DNA synthesis in ovarian oocyte nuclei and pronuclei of the mouse. Exp. Cell Res. 18 (1959) 190-194

Slizynski , B.M.: Irradiation of differentiating mouse oocytes. Curr. Mod. Biol. 3 (1969) 35-38

Speed, R.M.: The effects of ageing on the meiotic chromosomes of male and female mice. Chromosoma 64 (1977) 241-254

Sperling, K.: Untersuchungen zum Einfluß von Trenimon auf die Chromosomen und den Generationszyklus menschlicher Lymphozyten in vitro. Dissertation, Freie Universität Berlin (1968)

Sperling, K., Kaden, R., Grossgebauer, K., Sokol, K.: Nachweismöglichkeiten von Chromosomenschäden durch Cytostatica beim Menschen. Arch. Dermatol. Res. 244 (1972) 430-434

Spiegelman, M., Bennett, D.: A light- and electron-microscopic study of primordial germ cells in the early mouse embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. 30 (1973) 97-118

Stacey, K.A., Cobb, M., Cousens, S.F., Alexander, P.: The reactions of the radiominetic alkylating agents with macromolecules in vitro. Ann. NY Acad. Sci. 68 (1958) 682-701

Stadler, L.J.: The experimental modification of heredity in crop plants. I. Induced chromosomal irregularities. Sci. Agr. 11 (1931) 557-572

Stern, H., Hotta, Y.: DNA synthesis in relation to chromosome pairing and chiasma formation. Genetics, Suppl. 61 (1969) 1-39

Stopik, D.: Studie zur intrachromosomalen Bruchverteilung bei menschlichen Leukocyten. Hum. Genet. 14 (1971) 24-32

Szybalski, W., Iyer,V.N.: Crosslinking of DNA by enzymatically or chemically activated mitomycins and porfiromycins, bifunctionally "alkylating" antibiotics. Fed. Proc. 23 (1964) 946-957

Szybalsky, W., Iyer, V.N.: The mitomycins and porfiromycins. In: Gottlieb, D., Shaw, P.D. (Eds.) Antibiotics. Springer

Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, Vol. 1 (1967) pp. 211-245

Tarkowski, A.K.: An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. Cytogenetics 5 (1966) 394-400

Theiss, I.: Untersuchungen zur mutagenen Wirkung von Busulfan an Oozyten und embryonalen Leberzellen der Maus. Diplomarbeit, Universität Düsseldorf (1979)

Toledo, T.M., Harper, R.C., Moser, R.H.: Fetal effects during cyclophosphamide and irradiation therapy. Ann. Intern. Med. 74 (1971) 87-91

Tomasz, M., Lipman, R.:Alkylation reactions of Mitomycin C at acid pH. J. Am. Chem. Soc. 101 (1979) 6063-6067

Tsuchida, W.S., Uchida, I.A.: Chromosome aberrations in spermatocytes and oocytes of mice irradiated prenatally. Mutat. Res. 22 (1974a) 277-280

Tsuchida, W.S., Uchida, I.A.: Meiotic chromosome aberrations in mice irradiated prenatally. Tex. Biol. Med. 32 (1974b) 840-841

Tsuda, H.: An electron microscope study on the oogenesis in the mouse, with special reference to the behaviour of oogonia and oocytes at meiotic prophase. Arch. Histol. Jpn. 25 (1965) 533-555

Turbyfill, C.L., Soderwall, A.L.: Sensitivity of hamster to colchicine. Science 126 (1957) 749

Uchida, I.A., Lee, C.P.V.: Radiation-induced nondisjunction in mouse oocytes. Nature 250 (1974) 601-602

Uchida, I.A., Freeman, C.P.: Radiation-induced nondisjunction in oocytes of aged mice. Nature 265 (1977) 186-187

Utsumi, S.: Localized chromosome breakage induced by Mitomycin C in Tradescantia paludosa and Vicia faba root tips. Jpn. J. Genet. 46 (1971) 125-134

Vig, B.K.: Genetic toxicology of Mitomycin C, Actinomycins, Daunomycin and Adriamycin. Mutat. Res. 49 (1977) 189-238

Vogel, F., Jäger, P.: The genetic load of a human population due to cytostatic agents. Hum. Genet. 7 (1969) 287-304

Vogel, F., Röhrborn, G., Schleiermacher, E.: Chemisch-induzierte Mutationen bei Säuger und Mensch. Naturwissenschaften 58 (1971) 131-141

Vollmar, J.: Statistical problems in mutagenicity tests. Arch. Toxicol. 38 (1977) 13-25

Waring, M.J.: Drugs which affect the structure and function of DNA. Nature 219 (1968) 1320-1325

Watanabe, T., Shimada, T., Endo, A.: Mutagenic effects of cadmium on the oocyte chromosomes of mice. Nippon Eiseigaku Zasshi 32 (1977) 472-481

Watanabe, T., Shimada, T., Endo, A.: Mutagenic effects of cadmium on mammalian oocyte chromosomes. Mutat. Res. 67 (1979) 349-356

Watson, J.D., Crick, F.H.C.: A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171 (1953) 737-738

Weber, E.: Mathematische Grundlagen der Genetik. Gustav Fischer Verlag, Jena (1967)

Weissbach, A., Lisio, A.: Alkylation of nucleic acids by Mitomycin C and profiromycin. Biochemistry 4 (1965) 196-200

Whitehouse, H.L.K., Hastings, P.J.: The analysis of genetic recombination on the polaron hybrid DNA model. Genet. Res. 6 (1965) 27-92

Witschi, E.: Sex chromatin and sex differentiation in human embryos. Science 126 (1957) 1288-1290

Wolff, S.: Radiation Genetics. In: Errera, M., Forssberg, A. (Eds.) : Mechanisms in radiobiology 1. Academic Press, New York (1961)

Yamamoto, M., Shimida, T., Endo, A., Watanabe, G.-J.: Effects of low-dose X irradiation on the chromosomal non-disjunction in aged mice. Nature New Biology 244 (1973) 206-208

Zamboni, L., Merchant, H.: The fine morphology of mouse primordial germ cells in extragonadal locations. Am. J. Anat. 137 (1973) 299.336

Mein großer Dank gilt Herrn Professor Dr. G. Röhrborn, auf dessen Arbeiten zur Chemischen Mutagenese ich aufbauen durfte, für die durch ihn jederzeit erfahrene Förderung.

Desweiteren danke ich den Technischen Assistentinnen Frau Hammer, Frau Janssen, Frau Ricken, Frau Sauer und Frau Sezer, die durch ihren Einsatz an dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Die Untersuchungen wurden in großzügiger finanzieller Weise unterstützt durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie (Projekt Nr. CMT 05) und die Generaldirektion Forschung, Wissenschaft und Bildung der Europäischen Gemeinschaft (Projekt Nr. 175-77-1 ENV D).

SCHADEL GmbH BRD 8600 Bamberg Tel.: 0951/58461 u. 54414